



Universidad
Católica de
Valencia
San Vicente Mártir

TFG

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN
CIENCIAS DEL MAR

Uso de biomarcadores de contaminación en *Scylliorhinus canicula* (Linnaeus, 1758). Revisión bibliográfica.

Jone Echeverría Alberdi
Ana M^a Hernández Martínez
Curso 2018-2019



Facultad de Veterinaria
y Ciencias Experimentales
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar querría agradecer a la Universidad Católica de Valencia por darme la oportunidad de presentar este Trabajo Fin de Grado.

También me gustaría agradecer a los investigadores y trabajadores de CETEMARES por darme la oportunidad de sumergirme en el mundo de los biomarcadores. Especialmente a mi tutor PhD Marco Lemos mi tutor de prácticas y a PhD Sara Novais mi supervisora, no sin olvidarme de los investigadores del centro Lenia, Adriana, Luana, Ines, Luis, Ana Marta, Marta por permitirme entrometerme en sus investigaciones para poder así aprender de todos ellos.

A PhD Ana M^a Hernández Martínez, mi tutora este Trabajo Fin de Grado quería agradecerle no sólo toda la ayuda y el apoyo que me ha dado durante el proceso de desarrollo del trabajo sino que me gustaría agradecerle que me diera la oportunidad de trabajar con ella el año pasado, que creyera en mí y me dejara formar parte del “team shark”.

Gracias a todos los profesores por ayudarme a obtener nuevos conocimientos y por alentarme a conseguir mis propósitos. A Alejandro, mi segundo profesor, gracias por acogerme y enseñarme el mundo de los tiburones.

A mis compañeros de clase Myriam, Antonio, Belén, Alberto, Isabel, Sara y Esther, gracias por apoyarme en los peores momento, por soportarme durante las épocas de exámenes y de estrés, por ayudarme a aprender cosas nuevas y hacerme reir cada dos por tres.

A Joan por estar siempre dispuesto a ayudarme y creen en mis sueños, aunque no los entendiera y por estar ahí cuando he estado encerrada escribiendo.

Y por último, quiero agradecer a mi madre por apoyar incondicionalmente mis sueños y creer en mí, por escuchar mis locuras y ayudarme a llevarlas a cabo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción.....	3
1.1. Biomarcadores.....	6
1.1.1. Biomarcadores de estrés oxidativo.....	7
1.1.1.1. Superóxido dismutasa (SOD).....	8
1.1.1.2. Catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx).....	8
1.1.1.3. Glutatión reductasa.....	9
1.1.1.4. Sistema de glutatión (GSH).....	9
1.1.2. Biomarcadores de contaminantes orgánicos.....	9
1.1.2.1. Etoxiresorfina O-deetilasa (EROD).....	10
1.1.2.2. Glutatión S-transferasa (GST).....	10
1.1.3. Biomarcadores de contaminación por metales.....	11
1.1.3.1. Metalotioneínas (MT).....	11
1.1.3.2. Enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D).....	11
1.2. Grupos zoológicos de interés para estudio de biomarcadores.....	12
1.2.1.1. <i>Scyliorhinus canicula</i>	12
2. Objetivos.....	14
3. Material y métodos.....	15
3.1. Bases de datos.....	15
3.2. Criterios de inclusión.....	17
3.3. Criterios de exclusión.....	18
3.4. Ecuaciones de búsqueda.....	18
4. Resultados.....	23
4.1. Resultados del análisis bibliométrico.....	23
4.1.1. Biomarcadores.....	28
4.1.1.1. Frecuentes.....	29
4.1.1.2. Ocasionales.....	31
4.1.1.3. Puntuales.....	32
4.1.2. Biomarcadores en <i>Scyliorhinus canicula</i>	34
4.1.3. Grupos zoológicos de interés para estudio de biomarcadores.....	36
5. Discusión.....	43
5.1. Biomarcadores en <i>Scyliorhinus canicula</i>	43
5.1.1. Etoxiresorfina O-deetilasa (EROD).....	43
5.1.2. Glutatión S-transferasa (GST).....	44
5.1.3. Catalasa (CAT).....	46

5.1.4.	Metalotioneína (MT).....	47
5.1.5.	Carboxilesterasas.....	48
5.2.	Grupos zoológicos de interés para estudio de biomarcadores.....	48
5.2.1.	Teleósteos.....	48
5.2.2.	Moluscos.....	50
5.2.3.	Elasmobranquios.....	51
5.2.4.	Crustáceos.....	51
5.2.5.	Reptiles marinos (tortugas).....	52
5.2.6.	Mamíferos marinos.....	52
5.2.7.	Anélidos.....	52
5.2.8.	Equinodermos.....	52
6.	Conclusiones.....	51
7.	Líneas futuras.....	52
8.	Bibliografía.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de los diferentes biomarcadores bioquímicos que se utilizan para medir el estrés oxidativo (64)	8
Figura 2. Presentación simplificada del destino de los compuestos xenobióticos en la célula hepática. La ruta I, un posible mecanismo para la desintoxicación o toxicidad, y la ruta II, un posible mecanismo para la inducción de enzimas (65).....	10
Figura 3. Porcentaje de artículos encontrados en cada base de datos con la ecuación de búsqueda específica 1 (EBSP-1)	26
Figura 5. Productividad por año.....	28
Figura 6. Los contaminantes que se estudiaron con el biomarcador catalasa en los artículos seleccionados.....	30
Figura 7. Producción científica por años respecto a los artículos seleccionados en los que se utilizan biomarcadores en <i>Scyliorhinus canicula</i>	34
Figura 8. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan <i>Scyliorhinus canicula</i>	36
Figura 9. Producción científica por años respecto a los artículos seleccionados en los que se utilizan los distintos grupos zoológicos.....	36
Figura 10. Número de artículos en los que aparece cada especie.....	37
Figura 11. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan teleósteos.....	38
Figura 12. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan moluscos.....	39
Figura 13. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan elasmobranquios.....	40
Figura 14. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan crustáceos.....	41
Figura 15. Actividad de EROD en <i>M. barbatus</i> y <i>S. canicula</i> (valores medios \pm SD, n 1/4 10). El asterisco indica diferencias significativas entre <i>M. barbatus</i> y <i>S. canicula</i> (p <0:05) (105).....	43
Figura 16. Actividad de la enzima antioxidante etoxirresorufina O-deetilasa (EROD) en diferentes especies de peces con interés comercial del Mediterráneo noroccidental (21).....	44
Figura 17. Actividad de catalasa y glutatión S-transferasas en <i>M. barbatus</i> y <i>S. canicula</i> (valores medios \pm SD n 1/4 10). Los asteriscos indican diferencias significativas entre <i>M. barbatus</i> y <i>S. canicula</i> (p <0:05) (106).....	45

Figura 18. Actividad de la enzima antioxidante glutatión S-transferasa (GST) en varias especies de peces comerciales del Mediterráneo noroccidental (32).....	45
Figura 19. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en varias especies de peces comerciales del Mediterráneo noroccidental (21).....	46
Figura 20. Actividad de las metalotioneínas en <i>M.barbatus</i> y <i>S.canicula</i> (valores medios \pm SD n 1/4 10). Los asteriscos indican diferencias significativas entre <i>M.barbatus</i> y <i>S.canicula</i> ($p < 0.05$) (106).....	47
Figura 21. Niveles de metalotioneína en tejido branquial (A) y del tejido hígado (B) de <i>Scyliorhinus canicula</i> tras una semana en condiciones control y en condiciones de exposición a niveles subletales de Ni (587 $\mu\text{g} / \text{L}$), Cd (1124 $\mu\text{g} / \text{L}$) , Pb (2072 $\mu\text{g} / \text{L}$), Ag (10 $\mu\text{g} / \text{L}$) y Cu (635 $\mu\text{g} / \text{L}$) (N = 6, Media \pm SD, **: $P < 0.01$) ($P < 0.05$) (52).....	47
Figura 22. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) de biomarcadores de contaminantes orgánicos contra las estaciones y las variables ecológicas (nivel trófico-TL, natación, plenitud-F y tipo de dieta y código de crucero). A) peces de la plataforma continental y B) peces del talud. Todas las relaciones son significativas ($p < 0.05$) (32).....	48
Figura 23. Concentraciones de MT (mg g ⁻¹ w.w.) en función de la longitud total (cm) en diferentes tejidos: branquias (a), músculo (b) e hígado (c) del pez sable negro <i>A. carbo</i> (160).....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Descriptores seleccionados, sinónimos y traducción al inglés.....	19
Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda generales y específicas, utilizadas en las diferentes bases de datos. Búsquedas realizadas entre marzo y mayo 2019.....	21
Tabla 3. Resultados obtenidos con la ecuación general de búsqueda 1 (EGB-1).....	23
Tabla 4. Resultados obtenidos con la ecuación general de búsqueda 2 (EGB-2).....	24
Tabla 5. Resultados obtenidos con la ecuación de búsqueda específica 1 (EBSP-1).....	25
Tabla 6. Resultados obtenidos con la ecuación de búsqueda específica 2 (EBSP-2).....	27
Tabla 7. Tabla resumen de los biomarcadores utilizados en los artículos seleccionados.....	29
Tabla 8. Resumen de biomarcadores puntuales.....	34

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CCG-----	Cambio climático global
PCB-----	Bifenilos policlorados
PAH-----	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
DDT-----	Diclorodifeniltricloroetano
POP-----	Contaminantes orgánicos persistentes
OHC-----	Contaminantes orgánicos halogenados
CAT-----	Enzimas catalasa
GR-----	Glutación reductasa
EROD-----	Etoxiresorfina O-deetilasa
GST-----	Glutación S-transferasa
MT-----	Metalotioneína
ALA-D-----	Enzima ácido delta-aminolevulínico deshidratasa
LDH-----	Enzima lactato deshidrogenasa
SOD-----	Superóxido dismutasa
GPx-----	Glutación peroxidasa
GSH-----	Glutación reducido
GSSG-----	Disulfuro oxidado
tGSH-----	Glutación total
PBG-----	Porfobilinógeno
Hb-----	Hemoglobina
WOS-----	Web Of Science
FECYT-----	Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología
WoK-----	Web of Knowledge
ISI-----	Instituto de Información Científica
ETS-----	Sistema respiratorio de transporte de electrones
Cd-----	Cadmio
Pb-----	Plomo
Hg-----	Mercurio
Cu-----	Cobre
Zn-----	Zinc
As-----	Arsénico
EGB-1-----	Ecuación general de búsqueda 1
EGB-2 -----	Ecuación general de búsqueda 2
EBSP-1-----	Ecuación de búsqueda específica 1
EBSP-2-----	Ecuación de búsqueda específica 2

EBSP-3---- Ecuación de búsqueda específica 3
LDH----- Lactato deshidrogenasa
AChE----- Acetylcholinesterase
LPO----- Peroxidación de lípidos
MN----- Micronucleus
LMS----- Lysosomal membrane stability
TBARS---- Lipoperoxidación
BTI----- Biotransformation index
HSI----- Hepatosomatic index
BChE----- Butyrylcholinesterase
ALP----- Alkaline phosphatase
ORAC----- Oxygen radical absorbance capacity
ChE-----Cholinesterases
IDH----- Isocitrato deshidrogenasa
CEA----- Cellular energy allocation
PMS----- Post-mitochondrial supernatant
APX----- Peroxidasa de ascorbato
UGT----- Glucuronosiltransferasa
SULT----- Sulfotransferasa
MDH----- Malato deshidrogenasa
PY----- Protein yield
FAC----- Fluorescent Aromatic Compounds

RESUMEN

Actualmente, la contaminación marina constituye uno de los principales problemas ambientales, que afecta particularmente a la calidad ambiental de un importante número de hábitats y especies. Debido a ello, surge la necesidad de cuantificar los contaminantes presentes en el medio y medir sus efectos en la biota. En este sentido, existen biomarcadores de contaminación que pueden utilizarse en diferentes especies y que permiten relacionar la presencia de un determinado contaminante con su efecto sobre el organismo.

En el presente trabajo se ha realizado una revisión bibliográfica de los biomarcadores que se utilizan actualmente en diferentes especies de origen marino y, concretamente en *Scyliorhinus canicula*. Para ello se consultaron diferentes buscadores y bases de datos entre marzo y mayo de 2019.

Los principales biomarcadores utilizados se clasifican en: biomarcadores de estrés oxidativo (como superóxido dismutasa, catalasa o glutatión peroxidasa), de compuestos orgánicos (como ethoxyresorufin O-deethylase o glutathione-S-transferase) y de metales (como las metalotioneínas o enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase). Éstos se han aplicado en especies de diferentes grupos zoológicos, como teleósteos, moluscos, elasmobranquios, crustáceos, reptiles y mamíferos marinos, anélidos y equinodermos. Los más utilizados, hasta el momento, en *Scyliorhinus canicula* son EROD, GST, CAT y MT.

La producción científica en este campo se ha concentrado en los últimos 4 años, con un importante aumento de las publicaciones en 2018. Esto, junto a los pocos estudios encontrados en *Scyliorhinus canicula*, pone de manifiesto la oportunidad que supone el estudio de biomarcadores, concretamente de metales, en esta especie.

Palabras clave: Biomarcadores, *Scyliorhinus canicula*, organismos, metales pesados, contaminantes orgánicos.

ABSTRACT

Currently, marine pollution is one of the main environmental problems, which particularly affects the environmental quality of a significant number of habitats and species. Due to this, there is a need to quantify the contaminants present in the environment and measure their effects on the biota. In this sense, there are biomarkers of contamination that can be used in different species and that allows us to relate the presence of a certain contaminant with its effect on the organism.

In the present work a bibliographic review of the biomarkers that are currently used in different species of marine origin and, specifically in *Scyliorhinus canicula*, has been carried out. For this, different search engines and databases were consulted between March and May of 2019.

The most used biomarkers are classified as: biomarkers of oxidative stress (such as superoxide dismutase, catalase or glutathione peroxidase), organic compounds (such as ethoxyresorufin O-deethylase or glutathione-S-transferase) and metals (such as metallothioneins or enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase). These have been applied in species of different zoological groups, such as teleosts, mollusks, elasmobranchs, crustaceans, reptiles and marine mammals, annelids and echinoderms. The most used, so far, in *Scyliorhinus canicula* are EROD, GST, CAT and MT.

The scientific production in this field has been concentrated in the last 4 years, with a significant increase in publications in 2018. This, together with the few studies found in *Scyliorhinus canicula*, highlights the opportunity involved in the study of biomarkers, specifically of metals, in this species.

Key words: *Biomarker, Scyliorhinus canicula, organisms, heavy metals, organic pollutants.*

1. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre la naturaleza, las causas, el alcance y las implicaciones a largo plazo del cambio climático global (CCG) se ha convertido en el área de investigación más importante del siglo XXI en una amplia gama de disciplinas de ciencias naturales y sociales (1). Entre estas áreas de estudio encontramos el estudio de los contaminantes, tanto en el medio terrestre como en el marino y las implicaciones de estos para la para los organismos.

Hoy en día, existen sustancias contaminantes de muy diversa naturaleza entre los cuales destaca una gran variedad de sustancias químicas denominadas compuestos xenobióticos (2). Los xenobióticos, son compuestos naturales o sintéticos, "extraños" al cuerpo (2). Algunos de estos compuestos pueden ser degradados sin causar grandes problemas, sin embargo otros no son biodegradables o son difícilmente degradables (3). Este tipo de compuestos xenobióticos, que no se degradan con facilidad, tienden a acumularse en el medio ambiente causando serios problemas de contaminación (3).

Por otra parte, según Escobar (4), la actividad humana de origen continental es la causante del 70% de la contaminación marina global. En este sentido, la principal vía de entrada de contaminantes al océano es a través de los ríos. Las industrias vierten grandes cantidades de sustancias contaminantes y compuestos xenobióticos directamente a los ríos, aunque, en ocasiones, estas sustancias pueden llegar a los ríos de una forma menos directa, por ejemplo por escorrentía superficial (4). De este modo, los ríos pueden transportar hasta el 90% de dichas sustancias hasta el mar. Sin embargo, existen otras vías de entrada de contaminantes al océano, como es el caso de la escorrentía costera, la cual produce importantes efectos en los estuarios (4, 5).

Los contaminantes procedentes de las industrias son, por lo general, nutrientes, metales pesados, compuestos orgánicos específicos, radionúclidos y sustancias que alteran ciertas propiedades físico-químicas específicas, como el pH, salinidad, demanda de oxígeno, dureza, etc. (4). De estos contaminantes hay algunos que son contaminantes prioritarios debido a sus efectos o a su persistencia, como es el caso de los compuestos orgánicos persistentes (PCB, PAH, DDT...) y los metales pesados (arsénico, cadmio, cromo, cobalto, cobre, plomo, mercurio, níquel, estaño y zinc) (6).

Los metales pesados son constituyentes naturales del medio acuático, ya sea marino o de dulceacuícola, aunque forma natural se encuentran en concentraciones muy bajas (7). Esto

se debe a que entre los metales pesados hay algunos que son esenciales para la vida y otros que son meramente beneficiosos, pero muchos son altamente tóxicos (7). Además, en concentraciones suficientemente altas, los metales pesados son tóxicos para los organismos vivos, pudiendo provocar, entre otros efectos, cambios morfológicos (deformidades en la columna vertebral, el adelgazamiento de cascarones), efectos inhibitorios (en el crecimiento), cambios de comportamiento otros y mortalidad embrionaria (8).

Por otra parte, los compuestos orgánicos persistentes (POP) comprenden una serie de sustancias orgánicas y elementales, de origen antropogénico. Dentro de los POP se incluyen compuestos como los bifenilos policlorados (PCB) o el diclorodifeniltricloroetano (DDT), contaminantes orgánicos halogenados (OHCs), que debido a su naturaleza bioacumulativa y su toxicidad, tienen efectos negativos en la salud de los organismos, especialmente en las especies de mayor nivel trófico (9, 10). Pueden provocar cambios patológicos de gravedad variable en riñones, hígado y branquias (11, 12), deterioro de la reproducción y el crecimiento (13, 14), y posible supresión inmunológica (15-18).

Durante décadas, los POP han sido liberados al ambiente en grandes cantidades (19). Sin embargo, su uso está prohibido desde la década de 1970 debido a su propensión al transporte a larga distancia, su elevada persistencia ambiental, biocumulación y potencial biomagnificación; y debido, también, a la toxicidad inherente a estos compuestos. Pese a ello, todavía hoy en día representan un problema global (19). De hecho, algunos de los subproductos derivados de ciertos POP, como por ejemplo los clasificados como contaminantes organohalogenados (OHC), han sido encontrados en diferentes tipos de tejido animal (20).

Los problemas de la contaminación global mencionada anteriormente, pueden verse en el Mediterráneo Occidental, el cual sufre la presión antropogénica de las industrias (agrícolas, metalúrgicas, alimenticias) que, en menor o mayor medida, han vertido y vierten distintos contaminantes al medio; y de las pesquerías, que no solo contaminan el medio, sino que también pueden alterar el equilibrio de los ecosistemas con la sobrepesca (21). Debido a esta presión de origen antropogénico, entre otras causas, y de acuerdo con diversos estudios, se considera que el Mediterráneo está moderadamente contaminado en términos de contaminantes orgánicos persistentes (POP) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) (21). En lo que respecta a la contaminación por metales pesados, hay áreas con

altos niveles de concentración; sin embargo, en las zonas menos industrializadas, los niveles son más bajos, llegando en algunos casos a la conclusión de que la presencia de los metales se debe a procesos naturales (22).

En muchos casos, los contaminantes presentes en la columna de agua, el sedimento o el alimento, son fácilmente acumulados por organismos acuáticos, dando lugar a la bioacumulación y, posteriormente, a la biomagnificación a lo largo de la cadena trófica (23). Es por eso que existen muchos estudios que evalúan la contaminación del medio marino determinando la concentración de distintos contaminantes (como metales pesados o compuestos orgánicos) en los organismos (24-26).

Además, existen numerosos programas de monitoreo de este tipo de contaminación, como Mussel Watch, un programa de monitoreo de metales en moluscos a nivel mundial, o MEDPOL, un programa de monitoreo de PAHs en el Mediterráneo (27), centrado en caracterizar la presencia de sustancias químicas en la biota (28, 29).

Aunque las herramientas convencionales para el monitoreo ambiental pueden evaluar los niveles de contaminantes y el estado de salud ambiental, no pueden ayudarnos a entender la interrelación entre ambos. Ante esta incapacidad, surge la necesidad de buscar e implementar metodologías basadas en el uso de biomarcadores como posible relación causa-efecto entre el nivel de contaminación y el estado de salud ambiental (30, 31).

En los últimos años, cada vez más estudios se centran en el enfoque de los biomarcadores en vez de medir los niveles de contaminantes químicos que tienen los organismos (23, 32-38), aunque la corriente que más fuerza está cogiendo es la utilización de una respuesta integrada de biomarcadores (37, 39-42). Esto se debe a que, además de ser relevante para el medio ambiente, el uso de biomarcadores permite integrar la acción de mezclas complejas de sustancias químicas en organismos vivos (21), lo cual puede dar a conocer los efectos que tienen esas mezclas de contaminantes sobre los organismos. Es por esto que se están utilizando biomarcadores a nivel molecular / bioquímico como "señales de alerta temprana" para el estudio de las consecuencias negativas que, a largo plazo, pueda tener la contaminación para el ecosistema (43, 44).

BIOMARCADORES

En lo que respecta a la definición de biomarcador, hay aceptadas diversas definiciones dependiendo del autor. Por ejemplo, Melacon (45) define biomarcador como “una respuesta medida a cualquier nivel de organización biológica que puede estar relacionada con el impacto de contaminantes”. Pero hay otros autores, como Depledge *et al.*, (46), que definen biomarcador como “las respuestas de los organismos en los niveles de organización inferiores al individuo (átomos, moléculas, célula, tejidos, órganos y sistemas)” y el término bioindicador como “las respuestas en los niveles de organismo, población, comunidad y ecosistema”.

Los biomarcadores surgieron de la necesidad de investigar y detectar el impacto de los compuestos xenobióticos en el medio ambiente, lo que llevó a estudiar y desarrollar “marcadores” (efectos) que fueran consecuencia de la presencia de contaminantes en los organismos (31, 47, 48). Algunos de los “marcadores” son reacciones bioquímicas dentro del metabolismo de los organismos. Fue así como surgió el término biomarcador que fue definido en 1998 por el el Grupo de Trabajo de Definiciones de Biomarcadores del Instituto Nacional de la Salud (49).

Los biomarcadores tienen dos características importantes: en primer lugar, se pueden utilizar para identificar las interacciones entre el contaminante y el organismo; y, en segundo lugar, se pueden utilizar para la medición de efectos subletales (50).

En lo que respecta a los distintos tipos de biomarcadores existen los (i) biomarcadores utilizados con contaminantes orgánicos persistentes (POP), que son utilizados en la evaluación de alerta temprana de la exposición a contaminantes (21). Dentro de éstos están por ejemplo las enzimas catalasa de defensa antioxidante (CAT), el glutatión reductasa (GR), la fase I de la etoxiresorfina O-deetilasa (EROD) y la fase II de la glutatión S-transferasa (GST), que son analizadas como respuestas bioquímicas de la carga de PAH/PCB (21, 23, 32). Pero también hay (ii) biomarcadores centrados en otros aspectos como los metales pesados, donde se incluyen las metalotioneínas (MTs), enzima ácido delta-aminolevulínico deshidratasa (ALA-D), (35, 51, 52) o (iii) biomarcadores para el estrés oxidativo como pueden ser la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), concentraciones de glucosa en sangre, lactato, osmolalidad plasmática, amoníaco y adrenalina (53, 54).

Las ventajas y limitaciones del uso de los biomarcadores se han discutido ampliamente en diferentes estudios (30, 31, 45, 47, 55, 56).

Entre las principales ventajas destacan que proveen una medida integrada de la biodisponibilidad de los contaminantes para los organismos y que son un reflejo de la exposición de los organismos a los contaminantes, lo que quiere decir que las respuestas generadas son específicas para cada tipo de contaminante (47, 50). Otras ventajas son: (i) ayudan a establecer la importancia de las diferentes rutas de exposición, (ii) sirven para detectar la exposición y efectos tóxicos de los compuestos y metabolitos rápidamente metabolizables y eliminados (49), (iii) tienen la capacidad de integrar los diferentes niveles de organización biológica de manera que puede predecir en periodos de tiempo corto lo que puede suceder en el ecosistema a largo plazo (30, 31, 45, 47, 57, 58).

Entre las principales limitaciones destacan: (i) los efectos/respuestas de los organismos pueden variar con cambios de las distintas variables ambientales (50), por ejemplo la dieta y otros factores ambientales y fisiológicos pueden cambiar la respuesta del citocromo P450, así como su actividad EROD, que es un biomarcador hepático dependiente de CYP1A (30, 58); (ii) no siempre hay una relación directa entre la dosis de contaminante y la respuesta (dosis-respuesta); y (iii) no existen equipos adecuados para poder obtener los resultados e interpretarlos (30, 47).

Biomarcadores de estrés oxidativo

Los organismos tienen mecanismos de defensa para eliminar las especies de oxígeno reactivas (ROS) y prevenir el daño oxidativo en las macromoléculas (ADN, lípidos o proteínas). Dentro de estos mecanismos hay antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, como la superóxido dismutasa (SOD), una enzima responsable de la transformación de O_2 en H_2O_2 ; las enzimas catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx), las cuales se utilizan para eliminar el H_2O_2 , y la glutatión reductasa (GR), que reduce el glutatión oxidado, asegurando que el GSH esté disponible para actuar como un antioxidante en sí mismo o como un cofactor para GPx y GST (59-63).

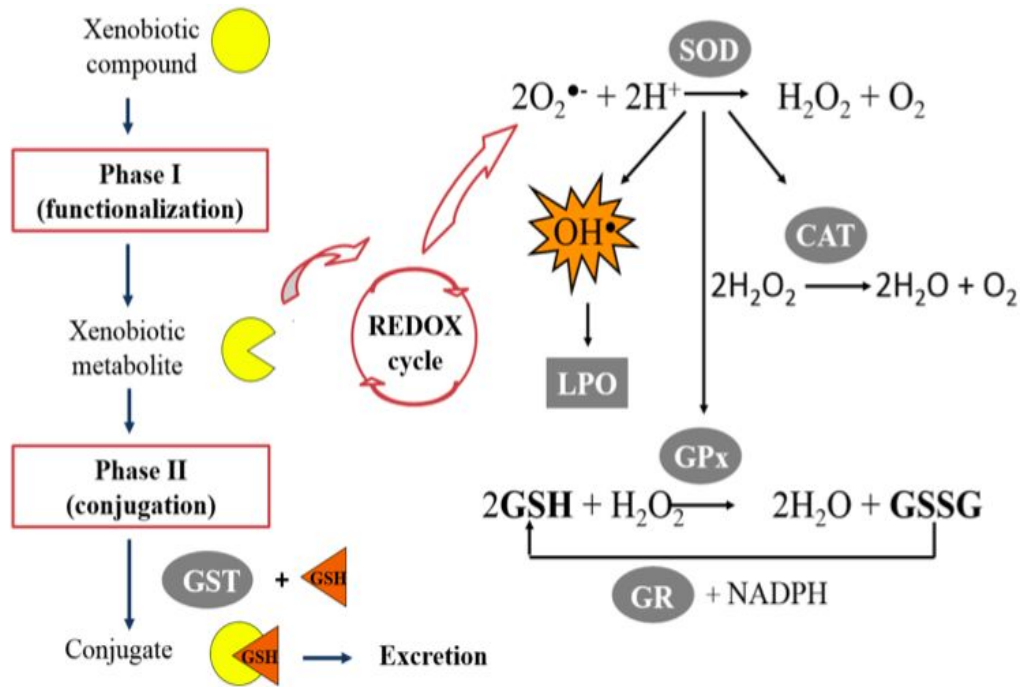


Figura 1. Esquema de los diferentes biomarcadores bioquímicos que se utilizan para medir el estrés oxidativo (64).

Superóxido dismutasa (SOD)

La metaloenzima superóxido dismutasa (SOD) suele ser uno de los agentes más importantes en el proceso de prevenir y contrarrestar los efectos negativos de las ROS siendo responsable de catalizar la conversión de aniones superóxido reactivos ($O_2^{\bullet-}$) para producir peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 se desintoxica posteriormente por dos tipos de enzimas: CAT y peroxidasas dependientes de tathione (GPOXs) (65). Se considera que los SOD desempeñan un papel antioxidante fundamental; su importancia está indicada por su presencia en todos los organismos aeróbicos examinados (66). Adicionalmente, la tasa de desmutación de $O_2^{\bullet-}$ catalizada por SOD se aproxima al límite de difusión, lo que la convierte en una de las enzimas más activas descritas (67). Aún así, las moléculas de H_2O_2 resultantes de la acción de la SOD pueden causar efectos dañinos y deben eliminarse de los organismos.

Catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx)

La catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx) son dos enzimas responsables de la eliminación de H_2O_2 y la prevención de su acumulación. La catalasa es una enzima que reduce específicamente el H_2O_2 , ya que contiene hematina que facilita la eliminación de H_2O_2 al metabolizarla en oxígeno molecular y agua. Por otro lado, tenemos algunas

peroxidasas que pueden reducir diferentes peróxidos (66, 68). CAT usa una de las moléculas de H_2O_2 como donante en la reducción de otra, mientras que las peroxidasas como GPx necesitan usar otras moléculas reductoras ya que la glutatión peroxidasa ayuda en la conversión de H_2O_2 a H_2O , que implica una oxidación concomitante de glutatión reducido (GSH) a su forma de disulfuro oxidado (GSSG).

Glutatión reductasa

La glutatión reductasa (GR), reduce el glutatión oxidado, asegurando que el GSH esté disponible para actuar como un antioxidante en sí mismo, o como un cofactor para GPx y GST (69), aumentando la solubilidad en agua de los compuestos xenobióticos, facilitando su excreción (59-62).

Sistema de glutatión (GSH)

El glutatión es un tripéptido que contiene los aminoácidos ácido gamma-glutámico, cisteína y glicina. El glutatión reducido (GSH) y el glutatión oxidado, el disulfuro de GSH (GSSG) son tioles intracelulares de importancia biológica, y se han utilizado alteraciones en la relación entre el glutatión total (tGSH) y el GSSG, llamado OSI (Índice de Estrés Oxidativo) para evaluar los efectos oxidativos estrés en peces in vivo (70-72).

Biomarcadores de contaminantes orgánicos

Los compuestos químicos exógenos y endógenos (como las hormonas sexuales), que experimentan el metabolismo de la fase I (reacciones de hidroxilación y de oxigenación) se pueden conjugar aún más con moléculas endógenas, como glutatión (GSH), a través de las glutatión S-transferasas (GST) y, por consiguiente, ser más fácilmente excretables (metabolismo fase II) (32).

Por ejemplo, los productos químicos xenobióticos pueden ser biotransformados en el hígado de acuerdo con el mecanismo simplificado de la ruta I que se puede observar en la figura 2, y que puede subdividirse en las fases I, II y III. La fase I es una alteración no sintética (oxidación, reducción o hidrólisis) de la molécula xenobiótica, que luego se puede conjugar en la fase II y catabolizar en la fase III (73).

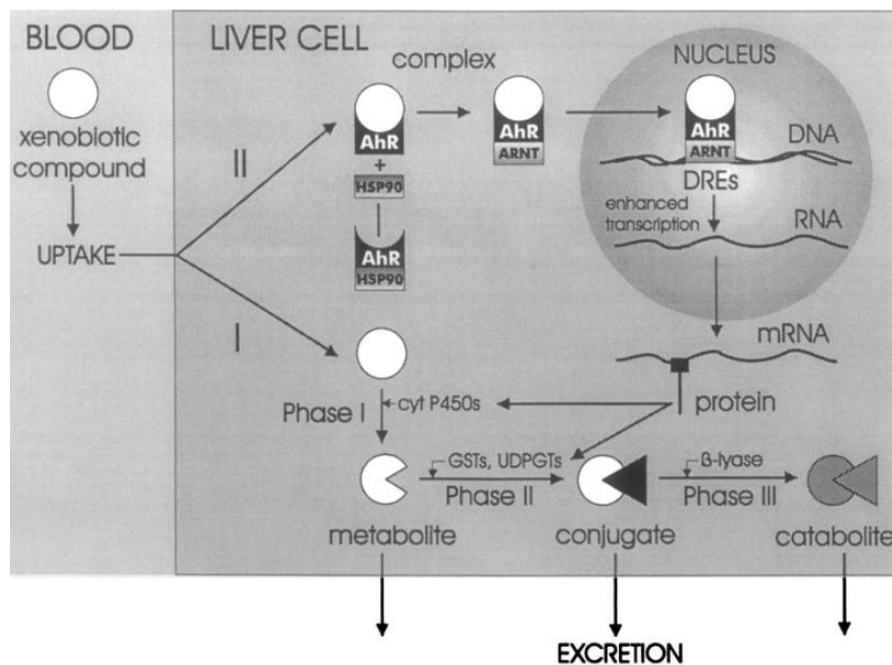


Figura 2. Presentación simplificada del destino de los compuestos xenobióticos en la célula hepática. La ruta I, un posible mecanismo para la desintoxicación o toxicidad, y la ruta II, un posible mecanismo para la inducción de enzimas (65).

EROD (Ethoxyresorufin O-deethylase)

EROD pertenece a la superfamilia del citocromo P450 (32, 47) y ha sido seleccionado para este estudio debido a que es el biomarcador hepático más aceptado para la medición de los compuestos “dioxin-like”, incluyendo la exposición a PAH (21). En particular, la forma CYP1A es una proteína terminal en el sistema de función mixta oxigenasa, indicativo del metabolismo de la fase I (principalmente reacciones de hidroxilación) (32). En la mayoría de teleósteos y elasmobranquios, su función catalítica principal se mide a través de la actividad de Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) (32).

Sin embargo, la dieta y muchos otros factores ambientales y fisiológicos pueden modular la respuesta del citocromo P450, así como su actividad EROD dependiente de CYP1A (30, 58). Además, en situaciones con altas tasas de contaminación se puede dar el caso de que se inhiba la actividad EROD, tal y como sucede con ciertos congéneres de PCB (74), hepatotoxinas (75, 76) o metales como el cadmio (77).

GST (glutathione-S-transferase)

La enzima GST (glutathione-S-transferase) pertenece a la familia de las isozimas metabólicas de la fase II, son diméricas, principalmente citosólicas y tienen amplias

propiedades de unión al ligando además de su función catalítica en la desintoxicación (78, 79) en la cual son capaces de catalizar la conjugación de la forma reducida de glutatión (GSH) a compuestos xenobióticos (80). Esto es importante ya que tanto los compuestos xenobióticos como algunos compuestos endógenos (p. Ej., Las hormonas sexuales) sufren el metabolismo de la fase I (p. Ej., Las reacciones de hidroxilación y de oxigenación), pero estos compuestos se pueden conjugar aún más, en metabolismo fase II, con moléculas endógenas, como GSH, a través de las glutatión S-transferasas (GST), haciendo así que sea más fácil la excreción de estos compuestos y la desintoxicación del organismo (21, 65).

Biomarcadores de metales

En el caso de la contaminación por metales pesados, antes de las respuestas tóxicas a la exposición, se inducen diferentes respuestas celulares (biomarcadores) que sirven como marcadores iniciales de efectos sub-letales (65). Entre los biomarcadores más sensibles y ampliamente utilizados para metales se encuentran ALA-D (ácido deshidratasa aminolevulínica) y metalotioneína (MT) (81).

Metalotioneínas

La metalotioneína (MT) es una proteína rica en cisteína que se une a metales como el cobre, zinc, cadmio y mercurio, para evitar que el metal induzca toxicidad celular. La MT tiene un bajo peso molecular, es estable al calor y no contiene residuos de aminoácidos aromáticos ni residuos de histidina (82). Las proteínas MT o similares a MT se han identificado en distintos grupos, incluidos microorganismos, invertebrados y muchos vertebrados. Además, participan en catálisis, almacenamiento, fenómenos inmunes, desintoxicación de metales (83) y la homeostasis de los metales esenciales (84), al igual que son capaces de secuestrar metales y protegen contra las condiciones de estrés oxidativo al eliminar los radicales libres (84). Por todo ello estas proteínas tienen un gran potencial para ser utilizadas como biomarcadores de metales pesados para evaluar sus efectos tóxicos (86).

Enzyme delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D)

La enzima ALA-D, también llamada porfobilinógeno (PBG) sintasa, cataliza la formación de una molécula de PBG, un precursor de la hemoglobina (Hb), a partir de dos moléculas de ácido aminolevulínico (ALA). ALA-D requiere cofactores Zn^{2+} para funcionar y contiene grupos tiol altamente activos, por lo tanto, otros metales pueden unirse al ALA-D, inhibiendo su actividad enzimática y disminuyendo los niveles de PBG (87, 88).

El Pb por ejemplo, es capaz de inhibir varias enzimas en la ruta de biosíntesis del hemo, como la coporfirinógeno oxidasa, la ferroquelatasa y la deshidratasa del ácido delta-aminolevulínica (ALA-D) (89). Debido a esto la ALA-D se considera un biomarcador selectivo y de respuesta rápida a la toxicidad por Pb, incluso a concentraciones de exposición muy bajas (90). Varios estudios han mostrado inhibición en la actividad ALA-D en función de la exposición a Pb (91, 92), y se ha encontrado que la actividad ALA-D se correlaciona negativamente con las concentraciones de Pb en sangre de peces (92). Hasta el momento, no se conoce que otros metales inhiban significativamente el ALA-D a no ser que la dosis de estos metales sea muy alta (93).

GRUPOS ZOOLOGICOS DE INTERÉS PARA ESTUDIO DE BIOMARCADORES

Los biomarcadores de metales se han utilizado en distintos tipos de organismos, como teleósteos (*Mullus barbatus*, *Merluccius merluccius*, *Micromesistius poutassou*, *Salmo trutta*) (21, 32, 81, 94, 95), moluscos (*Perna viridis*, *Chione elevata*, *Mytilus galloprovincialis*, *Patella depressa*) (96-99), reptiles (*Caretta caretta*, *Lepidochelys olivacea*) (6, 86) e incluso elasmobranquios (*Scyliorhinus canicula*, *Galeus melastomus*, *Carcharhinus leucas*, *Sphyrna tiburo*, *Carcharhinus limbatus*) (23, 32, 34).

Uno de los grupos zoológicos claves para los ecosistemas marinos son los elasmobranquios, más concretamente los tiburones, ya que al estar en la cumbre de la cadena alimenticia están más expuestos a la biomagnificación (100, 101). Debido a esta biomagnificación de metales pesados y POP, el sistema inmunológico de los tiburones se ve particularmente afectado, lo que lleva, en algunos casos, a una disminución de la población (102, 103, 104).

Scyliorhinus canicula

La familia de elasmobranquios Scyliorhinidae constituye una de las familias más grandes de tiburones, y dentro de ésta, la especie *Scyliorhinus canicula* (Género *Squalus*, Linnaeus, 1758), comúnmente conocida en España como pintarroja. *S. canicula* es una especie con una distribución muy extensa y abundante, que además es apropiada como modelo experimental debido a su fuerte resistencia al manejo y la relativa facilidad de captura (105). Se trata de una especie demersal que puede habitar desde la zona intermareal hasta el talud continental y se distribuye por todo el Mar Mediterráneo y algunas zonas del

Océano Atlántico, y el sur de Noruega (106, 107). En lo que respecta a su alimentación, *S. canicula* es un depredador nocturno oportunista que explota una amplia gama de crustáceos bentónicos y peces demersales, entre otras presas (108). En esta especie los machos y las hembras son sexualmente activos durante todo el año (109), y son ovíparos (110).

Pero la característica que hace a esta especie más interesante para su utilización en el estudio de monitoreo es que algunos estudios han demostrado que esta especie tiene un papel importante en el esquema trófico de las comunidades de peces demersales (111). Además, cumpliendo con la Política Pesquera Común de la Comisión Europea de desembarque de descartes (112), hay registrados altos porcentajes de *S. canicula* capturados como captura incidental (by-catch) de pesca de arrastre y en las encuestas nacionales se informa que las capturas y números aumentan cada año (113-116).

Sin embargo, estos organismos no tienen valor comercial para los pescadores, por lo que constituyen un importante by-catch, siendo una oportunidad para que los investigadores puedan obtener muestras con las que llevar a cabo sus estudios. De esta forma se pueden revalorizar los ejemplares que, de otra manera, pasarían a formar parte de los by-catch. Además, Sims *et al.* (117) confirmó que en esta especie hay una filopatría fuertemente sexo-específica, lo que tiene como resultado la segregación sexual de los individuos en la poblaciones. Es por todo esto que se puede considerar que *Scyliorhinus canicula* tiene un buen potencial para utilizarse para el monitoreo de zonas específicas.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todo lo expuesto anteriormente, el principal objetivo del presente Trabajo Fin de grado es realizar una revisión bibliográfica sobre los distintos biomarcadores que se han utilizado en la especie *Scyliorhinus canicula* y sobre los que se podrían utilizar con esta especie en un futuro. Para llevar a cabo este objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- analizar la producción científica en cuanto a la evolución del uso de biomarcadores;
- clasificar por grupos zoológicos en las que se ha analizado cada biomarcador;
- describir, después de una búsqueda bibliográfica exhaustiva, los distintos biomarcadores que se han utilizado en *Scyliorhinus canicula*;
- hacer una propuesta de potenciales biomarcadores para utilizar en *Scyliorhinus canicula*.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

La metodología empleada para llevar a cabo este Trabajo Fin de Grado fue el método de análisis documental clásico, a fin de obtener el “estado del arte” sobre el tema objeto de estudio, y detectar y analizar las diferentes fuentes de información.

En este sentido, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los potenciales biomarcadores que pueden ser utilizados con la especie *Scyliorhinus canicula*, a fin de evaluar los efectos que tienen sobre esta especie, ciertos compuestos xenobióticos presentes en el océano.

3.1. Bases de datos

El período de tiempo acotado para la búsqueda bibliográfica comprende desde enero de 2000 hasta mayo de 2019. Las bases de datos consultados fueron: Web Of Science (WOS), ScienceDirect, Scopus, Google Scholar, Pubmed, Dialnet y BioOne.

Web Of Science (WOS) es la principal base de datos de citas del mundo, con información multidisciplinaria de más de 18,000 revistas de alto impacto, más de 180,000 actas de conferencias y más de 80,000 libros de todo el mundo. Está gestionada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT), pero al principio era conocida como Web of Knowledge (WoK) fue creado originalmente por el Instituto de Información Científica (ISI), más tarde fue mantenido por Clarivate Analytics. Esta base de datos proporciona una cobertura integral de más de 100 años y más de mil millones de conexiones de referencia citadas. La amplia gama de publicaciones de investigación está vinculada a revistas de clase mundial que han sido rigurosamente seleccionadas. En lo que respecta a su accesibilidad es libre para instituciones como universidades y departamentos de investigación de las grandes corporaciones o centros de investigación asociados. El empleo de esta base de datos se debe a su amplia cobertura y visión multidisciplinar, lo que permite acceder a una gran cantidad de publicaciones de diferentes áreas de conocimiento.

ScienceDirect es una base de datos de publicaciones científicas, que es propiedad de la empresa llamada Elsevier, que brinda acceso a investigaciones de antes de 1995, y que además sus libros cubren 24 colecciones de asignaturas de disciplinas como bioquímica, genética y biología molecular, química, medicina clínica, ingeniería y medicina veterinaria. En los últimos 3 años se han añadido más de 195 millones de referencias citadas, que remontan a 1970, para completar así los registros que se remontan hasta 1788. Además, contiene más de 14 millones de publicaciones de más de 3,800 revistas y más de 35,000

libros de Elsevier, y más de 250,000 de esos artículos son de acceso libre. Aunque en muchos casos para obtener acceso al texto completo es necesario estar suscrito a la base de datos o, en su defecto, pagar de forma puntual para adquirir un artículo concreto. En lo que respecta a la justificación de la utilización de esta base de datos, la razón principal es la visión multidisciplinar que proporciona y la accesibilidad de las publicaciones.

Scopus es una base de datos de citas y resúmenes de literatura revisada que está activa desde 2004, y que incluye revistas científicas, libros y actas de congresos. Además, abarca temas de investigación en todas las disciplinas científicas y técnicas, desde medicina y ciencias sociales hasta artes y humanidades. Scopus, al igual que la WOS, está gestionada por la Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología (FECYT) la cual controla las licencias de este en España. Pero, además, al igual que la base de datos ScienceDirect, forma parte de la empresa llamada Elsevier la cual cuenta con plataformas multidisciplinarias de investigación lo cual le permiten la gestión de la investigación y la carrera profesional y le permiten lograr un impacto aún mayor en su campo. La utilización de esta base de datos se debe a razones muy similares a las de buscadores como la WOS o ScienceDirect, es decir debido a la capacidad de proporcionar una visión global multidisciplinar.

Google Scholar (Google Académico) es un buscador que proporciona una forma sencilla de buscar ampliamente la literatura académica. En lo que respecta a los tipos de textos se pueden buscar: artículos, tesis, libros, resúmenes y opiniones judiciales, de editores académicos, sociedades profesionales y otros sitios web. Este buscador está disponible desde 2004, y contiene 389 millones de documentos (incluidos artículos, citas y patentes) en enero de 2018. La utilización de este buscador se justifica porque es el que más documentos tienen e incluso cuando hay una publicación que responde a la búsqueda en alguna de las demás bases de datos, puede dirigirte a ellas, ya que ejerce como motor de búsqueda.

Pubmed es una base de datos que está en activo desde 1996 con más de 29 millones de citas de literatura biomédica de MEDLINE, revistas de ciencias de la vida y libros en línea. Las citas pueden incluir enlaces a contenido de texto completo de PubMed Central y los sitios web de los editores. La Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos mantiene en los Institutos Nacionales de Salud la base de datos como parte del sistema de

recuperación de información Entrez. Esta base de datos se utilizó para buscar documento con una naturaleza más técnica o específica.

Dialnet es una base de datos que comenzó como una cooperación bibliotecaria en la Universidad de La Rioja, pero ahora es una de las mayores bases de datos de artículos científicos hispanos accesibles de modo gratuito en Internet. En este portal se recopilan documentos publicados en España en cualquier lengua, publicados en español en cualquier país o que traten sobre temas hispánicos. Dentro de los documentos que podemos encontrar se incluyen artículos de revistas, capítulos de monografías colectivas, tesis doctorales, libros, etc. La utilización se justifica por la gran importancia que tiene esta base de datos y a que contiene muchos documentos que hablan de estudios llevados a cabo o centrados en España, pero, aunque se realizaron las búsquedas, solo se seleccionó 1 artículo.

BioOne fue la última base de datos que se utilizó. Es una base de datos creada sin ánimo de lucro, que reúne a sociedades científicas, editores y bibliotecas con más de 200 publicaciones de acceso abierto sobre ciencias biológicas, ecológicas y ambientales. BioOne proporciona un acceso a las bibliotecas con artículos de investigación de alta calidad. Pero al realizar las búsquedas en esta base de datos no se obtuvieron resultados.

Para seleccionar los documentos que finalmente se utilizaron en el presente Trabajo Fin de Grado, se definieron una serie de criterios de inclusión y de exclusión, que se detallan a continuación.

3.2. Criterios de inclusión

- artículos publicados en revistas científicas, en portales Web, libros, intervenciones en conferencias y revisiones.
- documentos publicados tanto en español, en inglés, en vasco, catalán o en portugués.
- trabajos cuyos títulos tienen relación con el ámbito de estudio de este trabajo y cuyos objetivos son acordes con la información que se pretende exponer.
- revisiones bibliográficas de la literatura relacionada en la que se ha realizado una selección previa de la información.
- artículos publicados después del 2000.

3.3. Criterios de exclusión

- estudios en un idioma diferente al español, inglés, vasco, catalán o portugués.
- investigaciones que tienen conclusiones que contradicen el resto de la literatura.
- publicaciones referentes a ambientes terrestres y/o dulceacuícolas.
- publicaciones referentes a organismos terrestres y/o dulceacuícolas.
- estudios cuyos objetivos no están relacionados de alguna manera con alguno de los objetivos de este trabajo.
- biomarcadores basados en genes y expresión genética.
- artículos publicados antes del 2000.

3.4. Ecuaciones de búsqueda

Para llevar a cabo la selección de documentos a utilizar durante la realización de este trabajo, se emplearon palabras claves, relacionadas con el tema/objetivo del estudio, conectadas con distintos operadores booleanos como: “AND” el cual utiliza para encontrar documentos que contengan varios términos, “OR” que se utiliza cuando queremos buscar documentos que contengan cualquiera de los términos que se busquen (se puede utilizar con sinónimos por ejemplo para cubrir más campo sobre un mismo tema), también está el operador booleano “NOT” que se utiliza cuando queremos que en los documentos no aparezca un concepto en concreto, de manera se buscarán documentos que contengan la primer término pero no el segundo.

Para poder ordenar las palabras utilizadas se realizó una tabla con los distintos descriptores y sus respectivos términos y sinónimos tanto en castellano como en inglés, ya que la mayoría de las bases de datos o buscadores están en inglés (tabla 1).

Tabla 1. Descriptores seleccionados, sinónimos y traducción al inglés

Descriptor	Términos sinónimos / Palabras relacionadas	Traducción al inglés
Biomarcador	Biomarcador (EROD, GST, Metallothionein, ALA-D, LDH, ETS)	Biomarker (EROD, GST, Metallothionein, ALA-D, LDH, ETS)
	Marcador	Marker
Contaminantes	Contaminantes	Contaminants, pollutants
	Compuestos xenobióticos	Xenobiotic compounds
	Presión antropogénica	Anthropogenic pressure
	COP (Contaminantes orgánicos persistentes) PAH, PCB, DDT	POP (Persistent organic pollutants) PAH, PCB, DDT
	Metales pesados (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, As)	Heavy metals (Cd, Pb, Hg, Cu, Zn, As)
	Elementos traza	Trace elements
Organismos marinos	Especies marinas	Marine species/organisms
	Teleósteo (pez)	Teleost (fish)
	Moluscos	Mussel
	Almeja	Clam
	Elasmobranquio	Elasmobranch
	Tiburón	Shark
	<i>Scyliorhinus canicula</i>	<i>Scyliorhinus canicula</i>
	Pintarroja	Lesser spotted dogfish

Durante la búsqueda bibliográfica, se utilizó el campo de “tema” mayoritariamente, menos en algunos casos específicos, en los que se buscaba un artículo en concreto, se utilizaron tanto el campo de “título” como el de “autor”. También se utilizó el campo “título” para acotar más la búsqueda cuando los documentos obtenidos en primer lugar, no estaban relacionados con la búsqueda realizada.

Primero, se realizó una búsqueda general para obtener una visión más global de la información, para después poder definir poco a poco la búsqueda entorno al objetivo de este trabajo. Para esto se utilizaron diferentes palabras claves las cuales están recogidas en la tabla 2.

- En la ecuación de la primera búsqueda general (EGB-1) se introdujeron las palabras claves: “biomarker”, “contaminant” y “marine organism” para poder obtener una información más general sobre los biomarcadores que se utilizan en organismos marinos para detectar/determinar contaminantes.
- La segunda búsqueda general se centró en los biomarcadores utilizados en tiburones, para lo cual se utilizó la segunda ecuación general de búsqueda (EGB-2) con las palabras claves: “biomarkers”, “contaminants” y “sharks” para, aún buscando una visión general, centrar la búsqueda en los organismos objeto de estudio.

Una vez adquirida la visión general, se utilizaron ecuaciones de búsqueda específicas (EBSP) para centrar la búsqueda y obtener información específica. Las ecuaciones de búsqueda específicas están recogidas en la tabla 2. En lo que respecta a los descriptores que se utilizaron en cada una de las búsquedas, éstos se describen a continuación:

- En la primera ecuación de búsqueda específica (EBSP-1) se utilizaron las palabras: biomarker*, POP*, PAH*, Heavy metals*, shark*. Se utilizaron estos para centrar la búsqueda en los biomarcadores que se utilizan para los distintos contaminantes en tiburones. Se utilizaron los distintos contaminantes y biomarcadores que aparecen en los diferentes artículos encontrados con las ecuaciones generales de búsqueda (EGB-1, EGB-2).
- La segunda búsqueda específica (EBSP-2) se centró en los diversos organismos que se utilizan con los distintos biomarcadores, por lo que se utilizaron las palabras

clave: EROD*, GST*, Metallothionein*, ALA-D*, LDH*, ETS* Marine organism* en un primer momento y luego se hicieron sub-búsquedas para diferenciar estudios sobre teleósteos y tiburones.

- También se realizó una búsqueda similar con la tercera ecuación de búsqueda específica (EBSP-3), pero centrada en la especie *Scyliorhinus canicula* y los biomarcadores que se han utilizado en ella. Para ello se utilizaron las palabras clave: EROD*, GST*, Metallothionein*, ALA-D*, LDH*, ETS*, *Scyliorhinus canicula** y Lesser spotted dogfish*.

Tabla 2. Ecuaciones de búsqueda generales y específicas, utilizadas en las diferentes bases de datos.
Búsquedas realizadas entre marzo y mayo 2019.

Ecuación de búsqueda	Abreviatura
(Biomarker* OR marker*) AND (Contaminant* OR xenobiotic* OR pollutant*) AND (Marine organisms* OR marine especies*)	Ecuación general de búsqueda 1 (EGB-1)
(Biomarker* OR marker*) AND (Contaminant* OR xenobiotic* OR pollutant*) AND (Elasmobranch* OR Shark* OR <i>Scyliorhinus canicula</i> * OR Lesser spotted dogfish*)	Ecuación general de búsqueda 2 (EGB-2)
(Biomarker* OR EROD OR GST OR Metallothionein* OR ALA-D* OR LDH* OR ETS*) AND (POP OR PAH OR PCB OR Heavy metals*) AND (Marine organism* OR fish* OR shark* OR Mussel* OR Clam* OR to tortoise*)	Ecuación de búsqueda específica 1 (EBSP-1)
(Biomarker* OR EROD* OR GST* OR Metallothionein* OR ALA-D* OR LDH* OR ETS*) AND (POP* OR PAH* OR PCB* OR Heavy metals*) AND (Elasmobranch* OR Shark* OR <i>Scyliorhinus canicula</i> * OR Lesser spotted dogfish*)	Ecuación de búsqueda específica 2 (EBSP-2)
(EROD OR GST OR Metallothionein* OR ALA-D* OR LDH* OR ETS*) AND (POP OR PAH OR PCB OR Heavy metals*) AND (Elasmobranch* OR Shark* OR <i>Scyliorhinus canicula</i> * OR Lesser spotted dogfish*)	Ecuación de búsqueda específica 3 (EBSP-3)

Una vez finalizada la búsqueda, se confeccionaron tablas para recoger los artículos encontrados y los seleccionados en cada base de datos, y para clasificar los artículos por autor, año de publicación, título y tema principal, revista, especie y biomarcador-contaminante. También se realizó un análisis de productividad anual con respecto a la cantidad de artículos seleccionados por cada año, dentro del periodo de estudio acotado, y la cantidad de artículos que utilizan *Scyliorhinus canicula* en estudios con biomarcadores por año.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados del análisis bibliométrico

En las tablas 3-6 están resumidos los resultados del análisis bibliométrico realizado a partir de la búsqueda realizada con las ecuaciones de búsqueda previamente descritas.

En la tabla 3 se pueden observar los resultados de la ecuación general de búsqueda 1 (EGB-1), donde se obtuvieron un total de 19.459 publicaciones científicas de las cuales se seleccionaron 51. Estas publicaciones aportaron una visión más general del tema, proporcionando información sobre los biomarcadores utilizados en organismos marinos. El número de publicaciones encontradas fue muy elevado, posiblemente debido a que se realizó una búsqueda más general, y a que se utilizaron distintas bases de datos. Sin embargo, en la base de datos BioOne no se obtuvieron resultados con la EGB-1, esto se puede deber a que BioOne es un buscador más específico y técnico para temas no relacionados con los descriptores del presente trabajo.

Tabla 3. Resultados obtenidos con la ecuación general de búsqueda 1 (EGB-1).

EGB-1	(Biomarker* OR marker*) AND (Contaminant* OR xenobiotic* OR pollutant*) AND (Marine organisms* OR marine especies*)	
FUENTES	ARTÍCULOS ENCONTRADOS	ARTÍCULOS EMPLEADOS
ScienceDirect	13,018	12
WOS	2.305	18
Dialnet	7	1
Scopus	200	7
Pubmed	149	1
Google Scholar	3.780	10
BioOne	0	0
TOTAL	19.459	51

En la búsqueda realizada con la ecuación general de búsqueda, EGB-2, (Tabla 4) se obtuvieron menos resultados que con la EGB-1 ya que en este caso la búsqueda, aún siendo general, se centraba en los tiburones y, concretamente, en *Scyliorhinus canicula* como organismo objeto de estudio. Además, se encontraron menos publicaciones sobre el

tema de interés, por lo que solo se seleccionaron 32 publicaciones de las 1.500 que se encontraron entre todas las bases de datos. Algunos de los artículos estaban repetidos respecto a búsquedas anteriores y respecto a las diferentes bases de datos utilizadas para la búsqueda. Cabe destacar que, en este caso, no se obtuvieron resultados en las bases de datos Dialnet y BioOne, lo cual puede deber a que estos buscadores son más técnicos y específicos, y no estaban relacionados con los descriptores de la ecuación general de búsqueda 2 (EGB-2).

Tabla 4. Resultados obtenidos con la ecuación general de búsqueda 2 (EGB-2).

EGB-2	(Biomarker* OR marker*) AND (Contaminant* OR xenobiotic* OR pollutant*) AND (Elasmobranch* OR Shark* OR Scyliorhinus canicula* OR Lesser spotted dogfish*)	
FUENTES	ARTÍCULOS ENCONTRADOS	ARTÍCULOS EMPLEADOS
ScienceDirect	1.336	7
WOS	35	7
Dialnet	0	0
Scopus	16	4
Pubmed	17	3
Google Scholar	96	11
BioOne	0	0
TOTAL	1.500	32

Con la primera ecuación de búsqueda específica, EBSP-1, (tabla 5) se obtuvieron 26.763 publicaciones en total de las cuales se seleccionaron 34, aunque al igual que en la búsqueda anterior, algunos artículos estaban repetidos. En la base de datos Dialnet no se obtuvieron resultados con la ecuación de búsqueda específica 1 (EBSP-1), posiblemente por las mismas razones por las que no se obtuvieron resultados con la EGB-2. Pero, por otro lado, la EBSP-1 es con la que más artículos se encontraron, esto se puede deber a que aunque se trate de una búsqueda específica, abarca un tema muy amplio (con distintos organismos y distintos biomarcadores). De las publicaciones encontradas con la EBSP-1 el 68,9 % procedían de la base de datos ScienceDirect (18.440) como se puede observar en la figura 3.

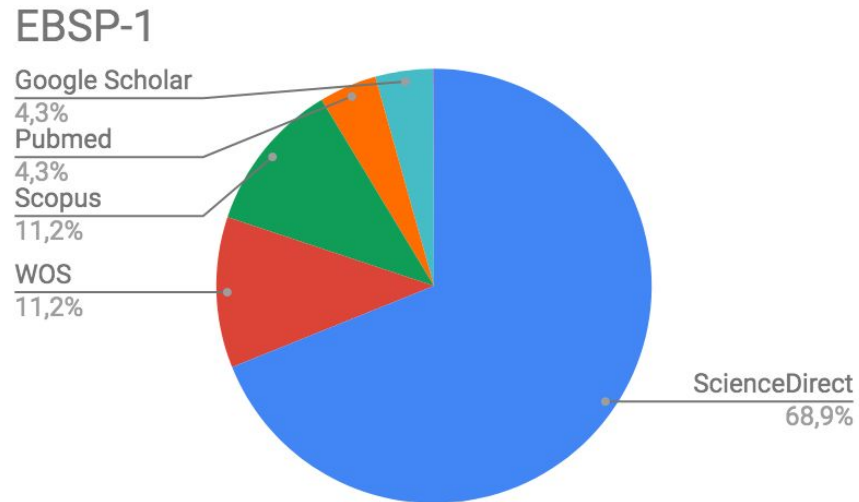


Figura 3. Porcentaje de artículos encontrados en cada base de datos con la ecuación de búsqueda específica 1 (EBSP-1).

A través de esta ecuación se buscaba encontrar información acerca de los biomarcadores que se han utilizado en el pasado con distintos tipos de organismos, para clasificarlos más adelante.

Tabla 5. Resultados obtenidos con la ecuación de búsqueda específica 1 (EBSP-1).

EBSP-1	(Biomarker* OR EROD OR GST OR Metallothionein* OR ALA-D* OR LDH* OR ETS*) AND (POP OR PAH OR PCB OR Heavy metals*) AND (Marine organism* OR fish* OR shark* OR Mussel* OR Clam* OR to tortoise*)	
FUENTES	ARTÍCULOS ENCONTRADOS	ARTÍCULOS EMPLEADOS
ScienceDirect	18.440	10
WOS	3.005	7
Dialnet	0	0
Scopus	3.005	3
Pubmed	1148	3
Google Scholar	1.150	11
BioOne	15	0
TOTAL	26.763	34

La ecuación de búsqueda específica, EBSP-2, (tabla 6) proporcionó menos resultados que la EBSP-1, 21.465 en total de los cuales se seleccionaron 35 publicaciones. La mayor parte de estas publicaciones totales (20.860) procedían de la base de datos ScienceDirect en las demás bases de datos hay un gran descenso en el número de publicaciones con respecto a la EBSP-1. La EBSP-3 es la búsqueda más específica de todas y con ella se buscaba obtener resultados más concretos sobre los biomarcadores que se han utilizado en la especie *Scyliorhinus canicula* en la bibliografía.

Con la EBSP-2 dos de los buscadores no mostraron resultados, Dialnet y BioOne. La razón puede ser, al igual que en la búsqueda con la EGB-2, que estos buscadores son más técnicos y específicos, y que no estaban relacionados con los descriptores de la ecuación general de búsqueda 2 (EGB-2).

El buscador en el que se obtuvieron un mayor número de artículos fue ScienceDirect, el cual proporcionó el 89,1% de los artículos encontrados con la EBSP-2 como se puede observar en la figura 4.

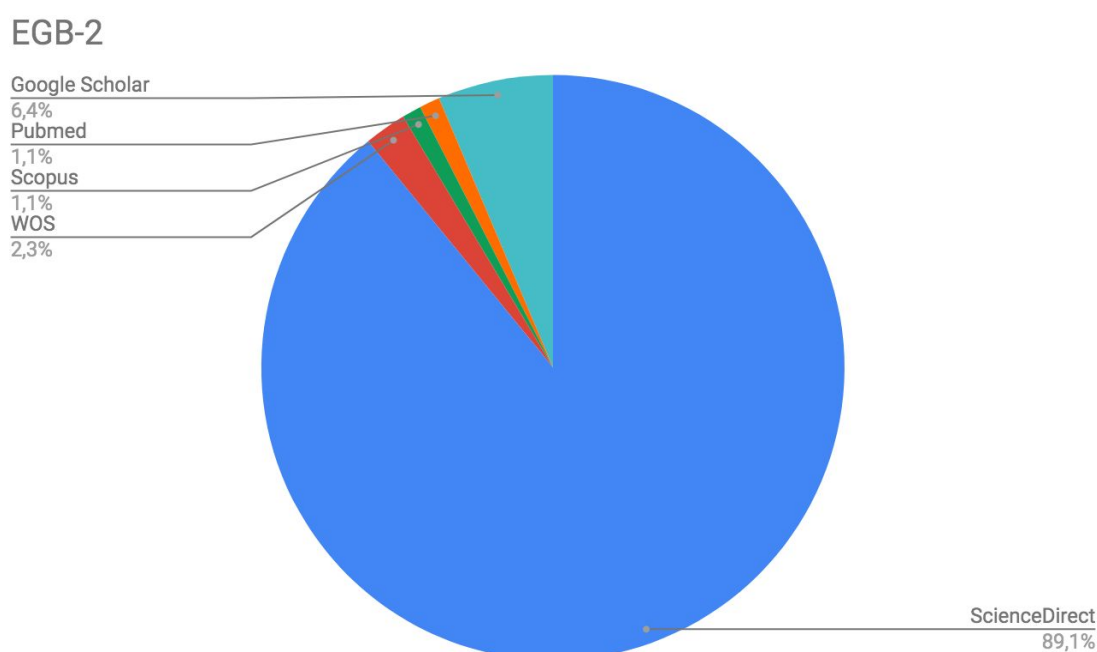


Figura 4. Porcentaje de artículos encontrados en cada base de datos con la ecuación de búsqueda específica 2 (EBSP-2).

Tabla 6. Resultados obtenidos con la ecuación de búsqueda específica 2 (EBSP-2).

EBSP-2	(Biomarker* OR EROD* OR GST* OR Metallothionein* OR ALA-D* OR LDH* OR ETS*) AND (POP* OR PAH* OR PCB* OR Heavy metals*) AND (Elasmobranch* OR Shark* OR Scyliorhinus canicula* OR Lesser spotted dogfish*)	
FUENTES	ARTÍCULOS ENCONTRADOS	ARTÍCULOS EMPLEADOS
ScienceDirect	20.860	10
WOS	19	6
Dialnet	0	0
Scopus	14	6
Pubmed	9	3
Google Scholar	563	10
BioOne	0	0
TOTAL	21.465	35

Aunque la cantidad total de los artículos sea 152, muchos de estos artículos se repetían en las distintas búsquedas, por lo que el recuento final, real, de artículos es de 78, pues se descontaron aquellos que se repetían. Los artículos seleccionados van desde enero de 2000 a mayo de 2019 pero, tal y como se explicará más adelante, se seleccionó un artículo que estaba fuera de los criterios de inclusión debido a que fue publicado en 1986. Esto se debe a que se trata del artículo más antiguo en el que se utilizan biomarcadores con el tiburón *Scyliorhinus canicula*.

Para asegurar que no había más artículos relacionados con los objetivos de este Trabajo Fin de Grado se realizó una última búsqueda (EBSP-3). Pero los resultados de la EBSP-3 no están expresados en una tabla porque no se obtuvo ningún artículo nuevo.

La figura 5 muestra la producción científica anual, dentro del período estudiado. Se puede observar un aumento del número de artículos, principalmente entre los años 2015 y 2018, siendo el número de artículos, en 2018, el doble que la media de los años anteriores.

Productividad por año

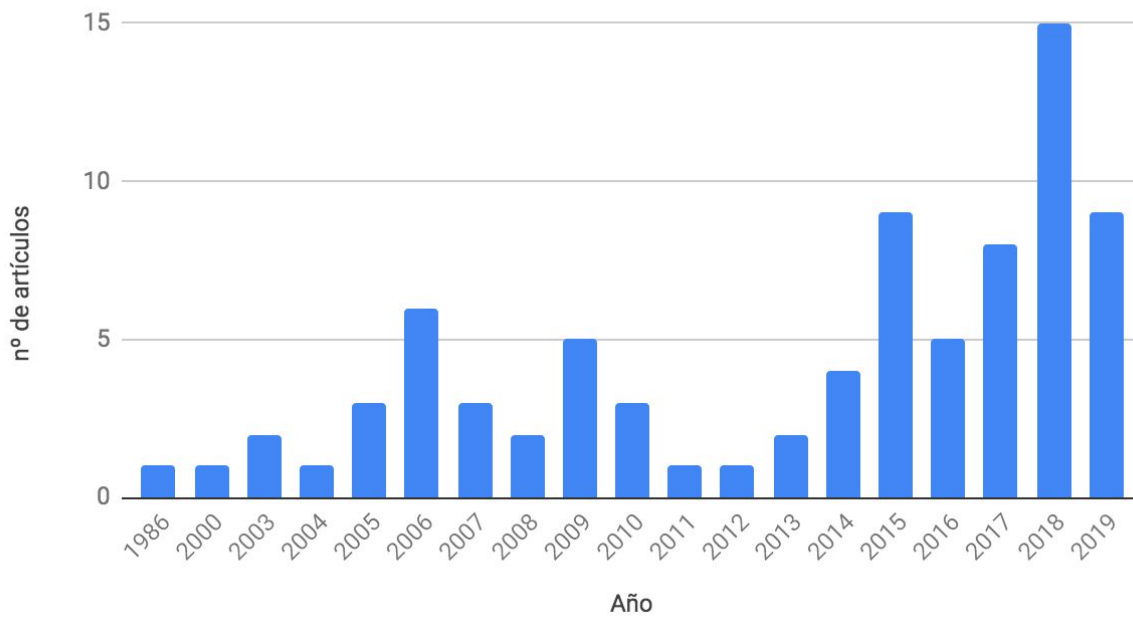


Figura 5. Productividad por año.

4.1.1. Biomarcadores

En los 78 artículos seleccionados se utilizan un total de 41 biomarcadores diferentes, los cuales han sido clasificados en tres grupos distintos, como se puede ver en la tabla 7. Los más utilizados (o frecuentes) en verde; los menos frecuentes pero que están presentes, al menos, en dos artículos (ocasionales) en amarillo; y los que aparecen solo en un artículo (puntuales) en rojo.

Tabla 7. Tabla resumen de los biomarcadores utilizados en los artículos seleccionados.

GRUPOS					
FRECUENTES		OCASIONALES		PUNTUALES	
GST	38/78	GR	8/78	butyrylcholinesterase (BChE)	1/78
EROD	34/78	DNA damage	7/78	alkaline phosphatase (ALP)	1/78
CAT	34/78	ALA-D	5/78	oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	1/78
Metallothionein (MT)	32/78	Micronucleus (MN)	5/78	Cholinesterases (ChE)	1/78
SOD	24/78	Carboxylesterase (CaE)	4/78	IDH	1/78
Acetylcholinesterase (AChE)	19/78	LDH	3/78	Lipofuscin accumulation	1/78
LPO	13/78	Lysosomal membrane stability (LMS)	3/78	Cytoskeleton alteration	1/78
GPx	12/78	lipoperoxidation (TBARS)	3/78	Cellular energy allocation (CEA)	1/78
		GSSG	2/78	Post-mitochondrial supernatant (PMS)	1/78
		Biotransformation index (BTI)	2/78	Electron transport system (ETS)	1/78
		hepatosomatic index (HSI)	2/78	Protein carbonyl levels	1/78
				APX	1/78
				UGT	1/78
				SLUT	1/78
				MDH	1/78
				1a-OH-corticosterone	1/78
				11-deoxycortisol	1/78
				Plasma glucosa	1/78
				Protein yield (PY)	2/78
				Fluorescent Aromatic Compounds (FAC)	2/78
				Liver glucosa	1/78

4.1.1.1. Frecuentes

Dentro de los artículos encontrados, el biomarcador más utilizado fue la glutatión S-transferasa (GST), ya que aparecía en 38 de los 78 artículos seleccionados. Este biomarcador se utiliza, en la mayoría de los casos, para contaminantes orgánicos persistentes (POP) como los PAHs, PCBs... (99, 118-120). Pero hay artículos en los que se utiliza como biomarcador para metales pesados y metales traza (121, 122).

El segundo biomarcador más utilizado es etoxiresorfina O-deetilasa (EROD), ya que aparece en 34 de los 78 artículos seleccionados. Como se había mencionado anteriormente, es el biomarcador hepático más aceptado para la medición de los compuestos “dioxin-like” entre los que encontramos los hidrocarburos aromáticos policíclicos PAH, PCB... (23, 123). Aunque también hay un artículo en el cual se utiliza EROD como biomarcador de metales (124).

Dentro de los biomarcadores utilizado frecuentemente también está la enzima catalasa (CAT), la cual, aparece en 34 artículos, según los cuales se utiliza tanto como biomarcador de POP(106, 125) como biomarcador de metales (86, 126), aunque un mayor porcentaje de artículos lo utilizan como biomarcador de POP(47,06%) (figura 6).

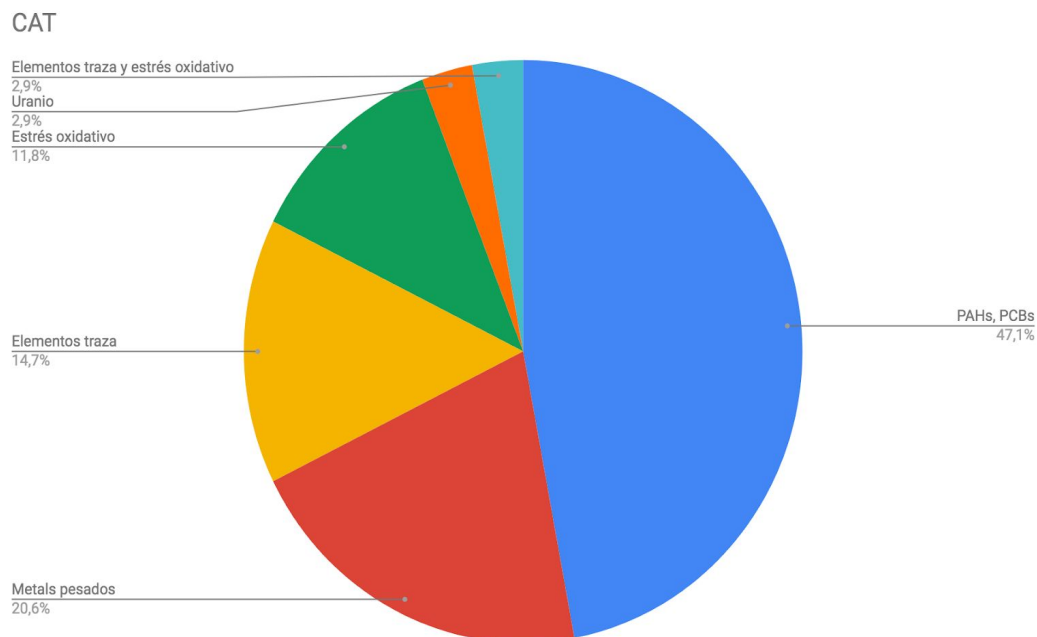


Figura 6. Los contaminantes que se estudiaron con el biomarcador catalasa en los artículos seleccionados.

Otro biomarcador muy utilizado son las metalotioneínas (MT), que se utilizan sobre todo como bioindicador para metales pesados (34, 127), aunque en algunos artículos lo utilizan como biomarcador de PAHs y PCBs (119) e incluso lo utilizan como biomarcador combinado de metales y de PAHs (42).

El cuarto biomarcador más utilizado en los artículos es la superóxido dismutasa (SOD), y aunque en el 41,66 % de los casos lo utilizan como biomarcador de POPs (PAHs, PCB...) (98, 119) también hay algunos autores que lo utilizan como biomarcador de metales (121, 125).

A continuación está la Acetylcholinesterase (AChE) la cual se utiliza en 19 de los 78 artículos seleccionados y en la mayoría de los casos los autores lo utilizan como biomarcador para POPs (128, 129). Sin embargo, hay artículos en los que lo utilizan como biomarcador de metales (96) e incluso de contaminantes que afectan la función sináptica (129).

La peroxidación lipídica (LPO) se utiliza como biomarcador de POPs (118, 125, 130), de metales e incluso de elementos traza (131). Aunque según los artículos seleccionados, en el 38,46% de los casos lo utilizan como biomarcador de compuestos orgánicos persistentes (POP).

El último biomarcador de este grupo es la glutatión peroxidasa (GPx), que se utiliza como biomarcador de compuestos orgánicos persistentes (POP) (132, 133) en el 50% de los artículos seleccionados en los que aparece. Los autores también lo utilizan como biomarcador de metales (97), elementos traza y de estrés oxidativo (134).

4.1.1.2. Ocasionales

En este grupo se incluyen los biomarcadores que aparecen en más de una ocasión pero que no aparecen en más de 10 artículos. Son un total de 13 biomarcadores, entre los cuales se encuentra la glutatión reductasa (GR), que aparece en 8 de los 78 artículos seleccionados. La GR se utiliza como biomarcador de compuestos orgánicos persistentes (POP), PAHs y PCBs (64, 133).

Otro de los biomarcadores interesantes es el ácido delta-aminolevulínico deshidratasa (ALA-D) y aparece en 5 de las 78 publicaciones seleccionadas. En estas publicaciones se

utiliza como biomarcador de metales (35, 42, 130, 135, 136), más concretamente para plomo (Pb) y cadmio (Cd).

Otro biomarcador utilizado es el daño en el ADN (DNA damage), el cual se utiliza como biomarcador de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y policlorobifenilos (PCBs) ya que hay una correlación negativa entre ambos (135, 137). Esto se debe a que la integridad del ADN puede verse muy afectada por los agentes genotóxicos debido a la ruptura de las cadenas de ADN, la pérdida de metilación y la formación de aductos de ADN (138).

Los micronúcleos (MN) son utilizados como biomarcadores de mutagenicidad (139). Esto es, en presencia de sustancias mutagénicas, se produce la aparición de micronúcleos en las células, que sirven como biomarcador de daños citogenéticos, como aberraciones cromosómicas o efectos aneugénicos (140). Los resultados de estas sustancias mutagénicas se deben a alteraciones en la función del huso mitótico durante la división celular o a la fragmentación del ADN, de modo que las células hijas tienen un núcleo principal y un micronúcleo más pequeño (130).

En el caso de las publicaciones encontradas, utilizaron micronúcleos principalmente como biomarcadores de PAHs y PCBs (141, 142).

Las carboxilesterasas (CaE o CbE) tienen la capacidad de responder a la presencia de contaminantes como piretroides, organofosforados y carbamatos, lo que las convierte en un adecuado biomarcador de exposición a estos contaminantes (36). En los artículos seleccionados, las carboxilesterasas se utilizaron como biomarcadores de PAHs, PCBs, pesticidas y algunas drogas, así como biomarcador para la exposición a sustancias neurotóxicas (21, 36, 99).

Otro de los biomarcadores ocasionales es la lactato deshidrogenasa (LDH), que se usa ampliamente como biomarcador de lesiones en órganos o tejidos, en condiciones de contaminación y refleja la capacidad metabólica de un tejido (143).

En la mayoría de las publicaciones en las que aparece (dentro de las seleccionadas para este trabajo) lo utilizan como biomarcador para metales ya que se han observado varias respuestas de enzimas en peces expuestos a elementos traza contaminantes, que indicaron

un aumento o una disminución de la actividad según la dosis, la especie y la ruta de exposición (144-146).

La estabilidad de la membrana lisosomal (LMS) aparece en 3 de los 78 publicaciones seleccionadas, utilizada como biomarcador de PAHs y PCBs (141, 142), aunque en el estudio de (126), también se utiliza como biomarcador de metales traza.

La glutatión oxidado (GSSG) aparece en 2 artículos de los 78 publicaciones seleccionadas. En uno de ellos se utiliza como biomarcador de metales (97), mientras que en el otro se utiliza como biomarcador de PAHs y PCBs (126).

4.1.1.3. Puntuales

Por último, están los biomarcadores que sólo aparecen en 1 artículo, o que aparecen en 2 artículos que hablan del mismo experimento, o no se consideran biomarcadores importantes, como por ejemplo ciertos índices. Es el caso del índice de biotransformación, que es la ratio de dos biomarcadores (EROD/GST), o el índice hepatosomático (HSI) (21, 32).

Otros biomarcadores puntuales son las colinesterasas (ChE), que se utilizan para medir la exposición de los organismos a contaminantes neurotóxicos, o las butirilcolinesterasa (BChE), que se utilizan como biomarcadores de PAHs y PCBs (98).

Otros biomarcadores considerados puntuales para este Trabajo Fin de Grado, están recogidos en la tabla 8. En la mayoría de artículos en los que aparecen, no se especifica cómo funciona el biomarcador o con qué contaminante se relaciona.

Tabla 8. Resumen de biomarcadores puntuales

Biomarcadores	Contaminantes
Fluorescent Aromatic Compounds (FAC)	PAHs, PCBs
oxygen radical absorbance capacity (ORAC)	
alkaline phosphatase (ALP)	
lipofuscin accumulation	
cytoskeleton alteration	
1a-OH-corticosterone	
11-deoxycortisol	
Plasma glucosa	
Liver glucosa	
IDH	Metales
APX	
protein carbonyl levels	Trace element
MDH	
SLUT	Enzimas detox.
UGT	
cellular energy allocation (CEA)	No se especifica el contaminante
post-mitochondrial supernatant (PMS)	
electron transport system (ETS)	

4.1.2. Biomarcadores en *Scyliorhinus canicula*

Se han seleccionado 8 artículos que utilizan la especie *Scyliorhinus canicula* para medir la contaminación del medio y la respuesta de este organismo a través de distintos biomarcadores. Uno de estos artículos se publicó en 1986 (147), pero se aceptó ya que es el primer artículo que analiza biomarcadores en esta especie. Los demás artículos van desde el 2004 al 2017, como se puede observar en la figura 7. En la figura se puede ver que hay un aumento de artículos en el año 2010, pero aún así el número de artículos, 3, sigue siendo muy bajo. Además, la cantidad de artículos no sigue la misma tendencia en los años posteriores, sino que solo hay un artículo más reciente, el cual fue publicado en el 2017 (36).

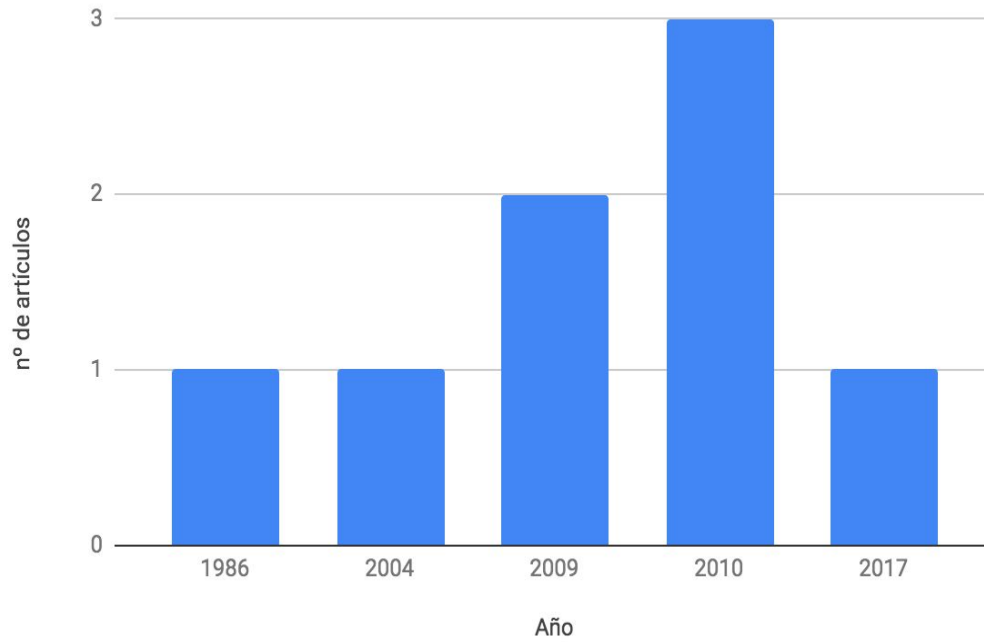


Figura 7. Producción científica por años respecto a los artículos seleccionados en los que se utilizan biomarcadores en *Scyliorhinus canicula*.

En los artículos seleccionados se utilizan 17 biomarcadores diferentes y algunos de ellos se utilizan en más de un artículo como, por ejemplo, EROD, GST o metalotioneína (MT).

En la figura 8 se puede observar el número de veces que aparece cada biomarcador en los artículos que utilizan la especie *Scyliorhinus canicula*. Los más utilizados son EROD, GST y CAT, que se utilizan como biomarcadores de compuestos orgánicos persistentes (POP), y el biomarcador utilizado para metales es la metalotioneína (MT), la cual es utilizada en 2 de los 8 artículos en los que aparece *S.canicula*.

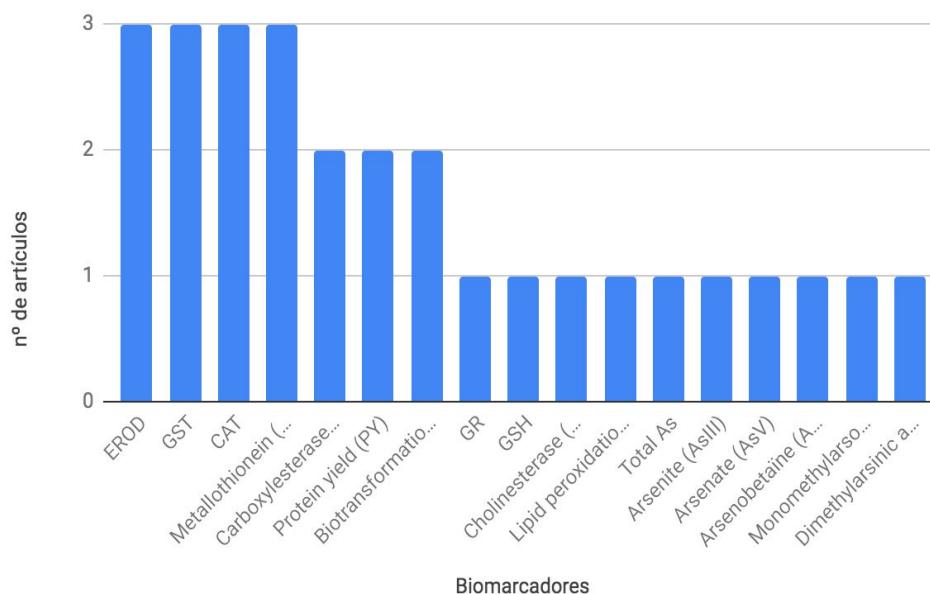


Figura 8. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan *Scyliorhinus canicula*.

4.1.3. Grupos zoológicos de interés en el estudio de biomarcadores

En los artículos seleccionados se utiliza un total de 144 especies de animales, siendo éstas de distintos grupos y filos como, por ejemplo, teleósteos (32, 35, 135), elasmobranquios (21, 36, 64), moluscos (143, 148), crustáceos (119, 132), mamíferos marinos (133), reptiles marinos (tortugas) (127, 135), anélidos (149) y equinodermos (94).



Figura 9. Producción científica por años respecto a los artículos seleccionados en los que se utilizan los distintos grupos zoológicos.

Teleósteos

El grupo de los teleósteos es el más numeroso en especies, con 74 especies estudiadas. Las más utilizadas en los artículos seleccionados son *Mullus barbatus* y *Merluccius merluccius*, los cuales aparecen en 5 artículos diferentes de los 29 en los que se utilizan teleósteos de los 78 seleccionados (32, 35, 95, 137, 150).

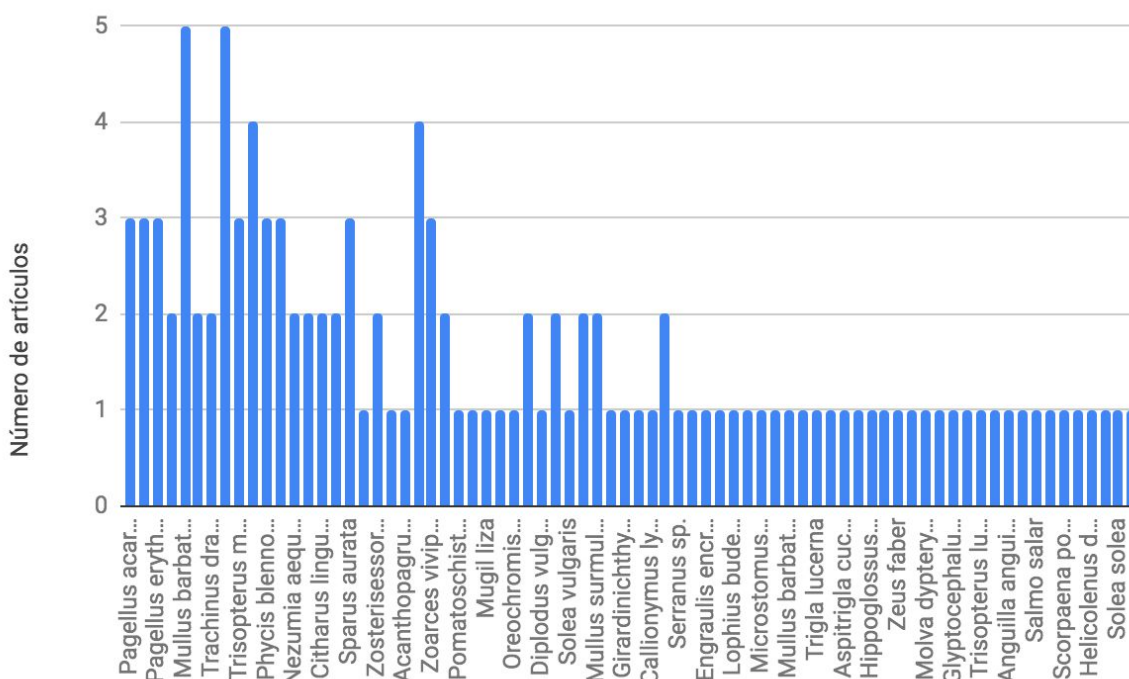


Figura 10. Número de artículos en los que aparece cada especie.

En lo que respecta a los biomarcadores utilizados en teleósteos, en la figura 11 se puede observar como el más utilizado es la etoxiresorfina O-deetilasa (EROD) el cual aparece en 18 de los 29 artículos que mencionan teleósteos (21, 32, 42, 58, 118, 124, 125, 136, 140, 142, 149, 151-156) y se utiliza como biomarcador de compuestos orgánicos persistentes (POP). Los siguientes más utilizados son GST y CAT, los cuales aparecen en 14 de los 29 artículos (21, 32, 118, 124, 125, 134, 140, 141, 144, 151, 153, 154, 157, 158) y también se utilizan como biomarcadores de POPs, como los PAHs y PCBs.

Otro de los biomarcadores muy utilizados en teleósteos son las metalotioneínas (MTs), que aparecen en 11 de los 29 artículos (42, 84, 132, 137, 142, 150, 153, 154, 156, 158, 159), y que se utilizan como biomarcadores para metales.

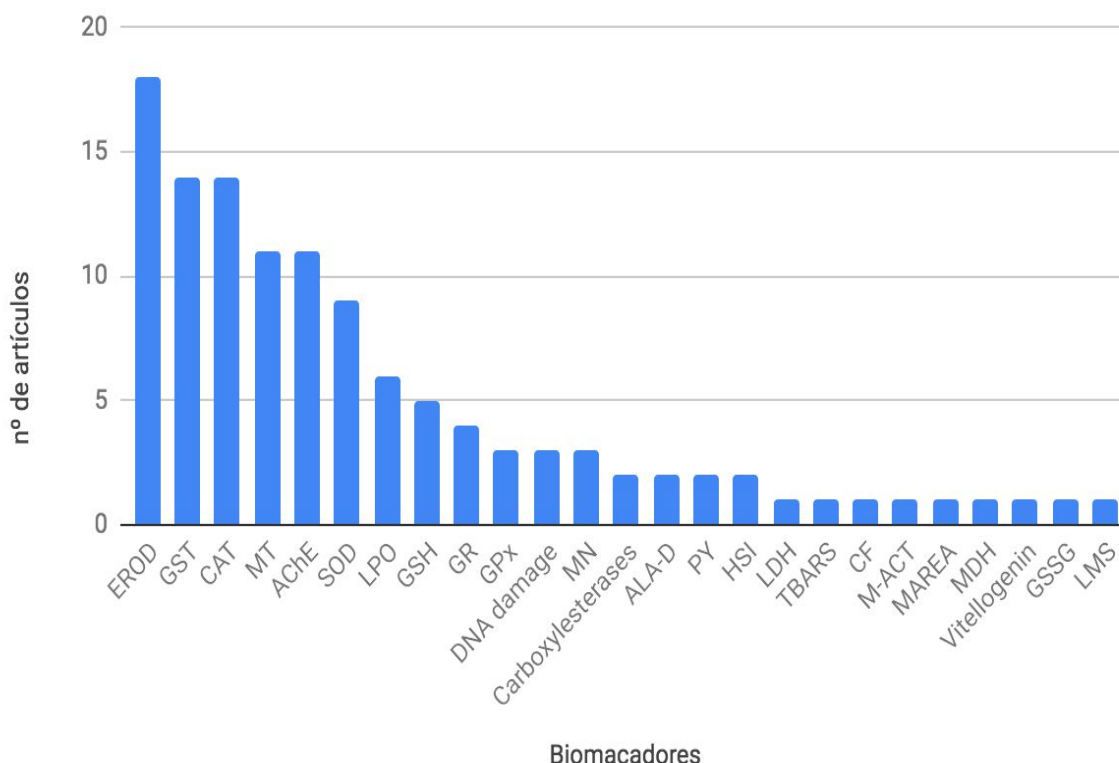


Figura 11. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan teleósteos.

Moluscos

El segundo grupo zoológico más utilizado son los moluscos, considerando los artículos seleccionados. Concretamente, se utilizan en 23 artículos de los 78 seleccionados y en ellos se mencionan 25 especies de moluscos (bivalvos, gasterópodos, cefalópodos, etc....). La especie más utilizada es *Mytilus galloprovincialis*, que aparece en 5 artículos diferentes (96, 119, 143, 148, 160).

En este sentido, los biomarcadores más utilizados en moluscos son GST, que aparece en 15 de los 23 artículos (96, 98, 99, 119-121, 148, 161-167) y CAT, que aparece en 13 artículos (97, 98, 119, 121, 126, 131, 160, 162-167), podemos ver un resumen de la cantidad de veces en las que aparece cada biomarcador en la figura 12. Ambos se utilizan como biomarcadores de compuestos orgánicos persistentes (POP). Otro biomarcador utilizado frecuentemente en moluscos son las metalotioneínas (MTs) que, como ya se ha comentado, es utilizado como biomarcador de metales, apareciendo en 10 de los artículos seleccionados.

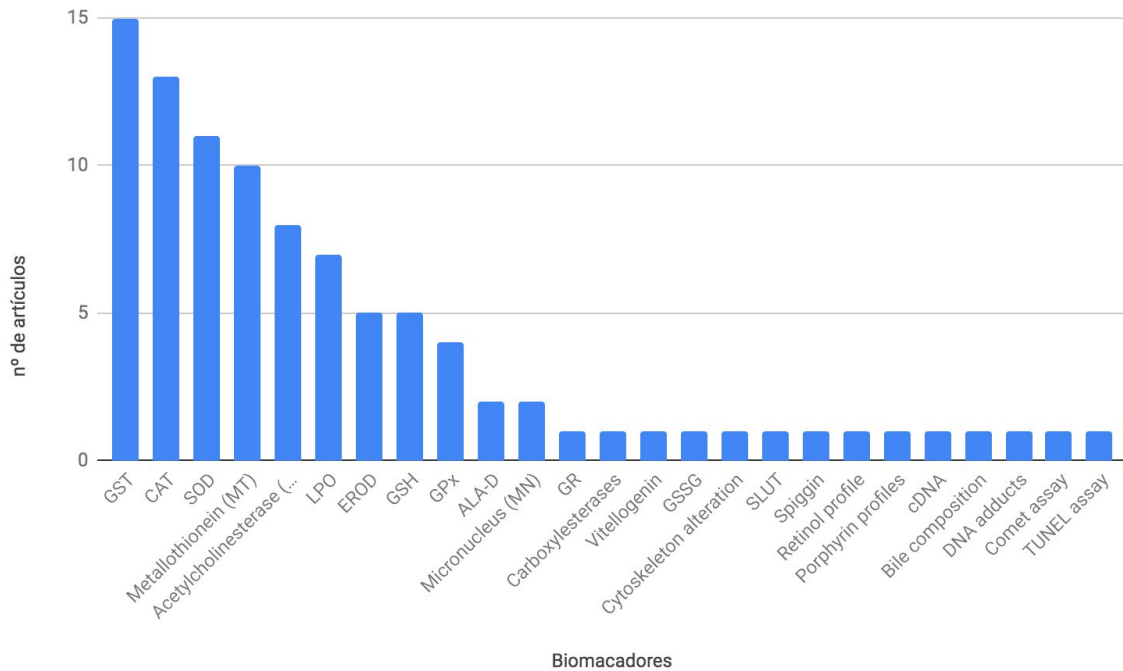


Figura 12..Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan moluscos.

Elasmobranquios

El tercer grupo más utilizado son los elasmobranquios, dentro de los cuales están los tiburones y las rayas. Aparecen en 20 de los artículos seleccionados (21, 23, 32, 33, 34, 36, 52, 94, 95, 106, 123, 147, 168-175) y en total se utilizan 27 especies distintas, como por ejemplo *Prionace glauca* (36, 64), *Carcharhinus leucas* (23, 33) y *Scyliorhinus canicula* (21, 106).

El biomarcador utilizado con más frecuencia en elasmobranquios es la metalotioneína (MT), la cual aparece en 7 de los 20 artículos seleccionados (33, 34, 52, 106, 170, 172, 174), y que se utilizan como biomarcador de metales.

Como se puede observar en la figura 13, otros biomarcadores utilizados con frecuencia en tiburones dos son EROD y GST, los cuales se utilizan como biomarcadores de compuestos orgánicos persistentes (POPs) entre los que podemos encontrar PAHs y PCBs. Al igual que los biomarcadores CAT y SOD que también se utilizan frecuentemente en tiburones y se utilizan como biomarcadores de POPs.

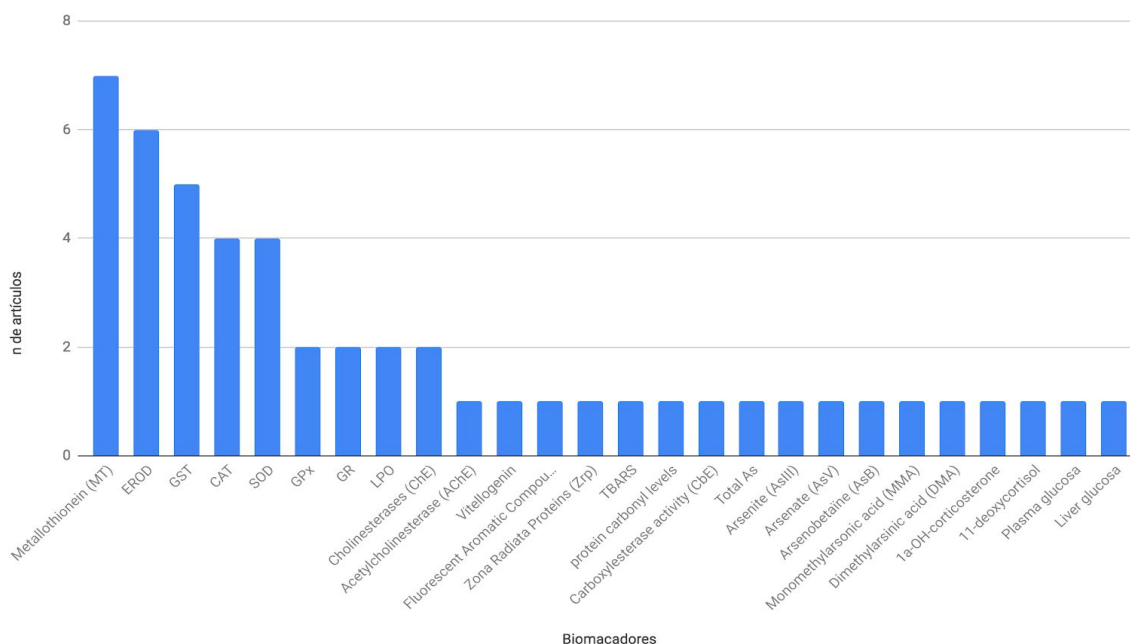


Figura 13. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan elasmobranchios.

Crustáceos

En referencia a los crustáceos, sólo 5 artículos se centran en su estudio, apareciendo hasta 10 especies distintas. La más utilizada en los artículos seleccionados es *Crangon crangon* (93, 150).

Los dos biomarcadores más utilizados en crustáceos son GST y CAT, presentes en 3 de los 5 artículos (119, 132, 149). GST y CAT se utilizan como biomarcadores de compuestos orgánicos persistentes (POPs), al igual que EROD, que aparece en 2 artículos (132, 149). En lo que respecta a la metalotioneína (MT), aparece en 2 de los 5 artículos (132, 176). A continuación (figura 14) se puede observar los biomarcadores utilizados en los artículos con distintas especies de crustáceos.

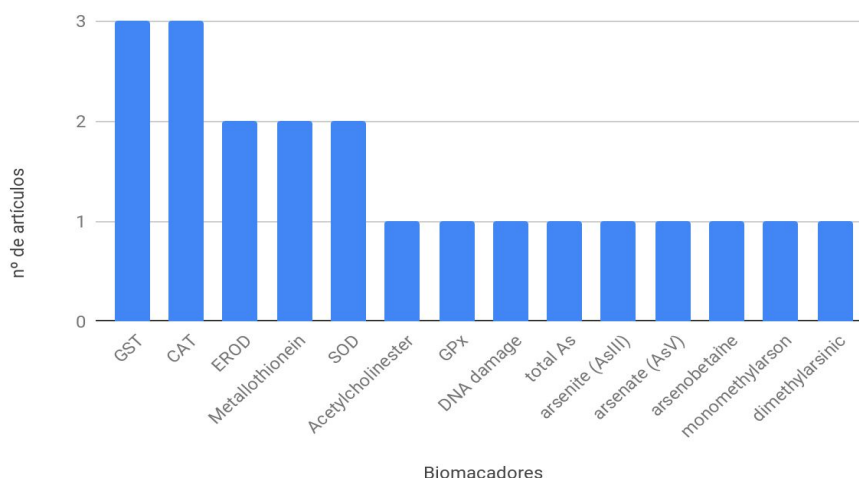


Figura 14. Gráfico resumen del número de artículos en el que se utiliza cada biomarcador en los artículos en los que utilizan crustáceos.

Reptiles marinos (tortugas)

Las tortugas marinas aparecen en 3 artículos distintos, estudiando 4 especies diferentes: *Caretta caretta*, *Chelonia mydas* (127), *Lepidochelys olivacea* (86) y *Testudo graeca* (135).

El biomarcador más utilizado en estas especies es la metalotioneína (MT), presente en 2 de los artículos (86, 127). Otro biomarcador presente en estos estudios, y que se utiliza como biomarcador de metales, es la ALA-D.

Mamíferos marinos

Únicamente una especie de mamífero marino, el delfín *Tursiops truncatus*, aparece en 1 de los artículos seleccionados (133). Los biomarcadores utilizados en este caso fueron GST, GR, GPx y SOD, que se utilizan como biomarcadores de compuestos orgánicos persistentes (POP) como los PAHs y PCBs.

Anélidos

Únicamente en 1 de los artículos seleccionados se utilizaba una especie de anélido poliqueto, *Nereis diversicolor* (149). Los biomarcadores utilizados en su estudio fueron EROD, GST, CAT, SOD y el daño en el DNA, como biomarcadores de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y policlorobifenilos (PCBs).

Equinodermos

Sólo en uno de los artículos seleccionados (94) se utiliza un erizo de mar, *Paracentrotus lividus*. En el estudio se utilizaron diversos biomarcadores específicos para el arsénico.

5. Discusión

5.1. Biomarcadores en *Scyliorhinus canicula*

A continuación, se analiza los resultados más relevantes de los biomarcadores utilizados en *Scyliorhinus canicula*, a partir de los artículos seleccionados.

5.1.1. Etoxiresorfina O-deetilasa (EROD)

En el caso del estudio realizado por Gorbi *et al.* (106), y como puede observarse en la figura 15, la actividad de la etoxiresorfina O-deetilasa (EROD) es muy inferior en *S.canicula* que en *Mullus barbatus*.

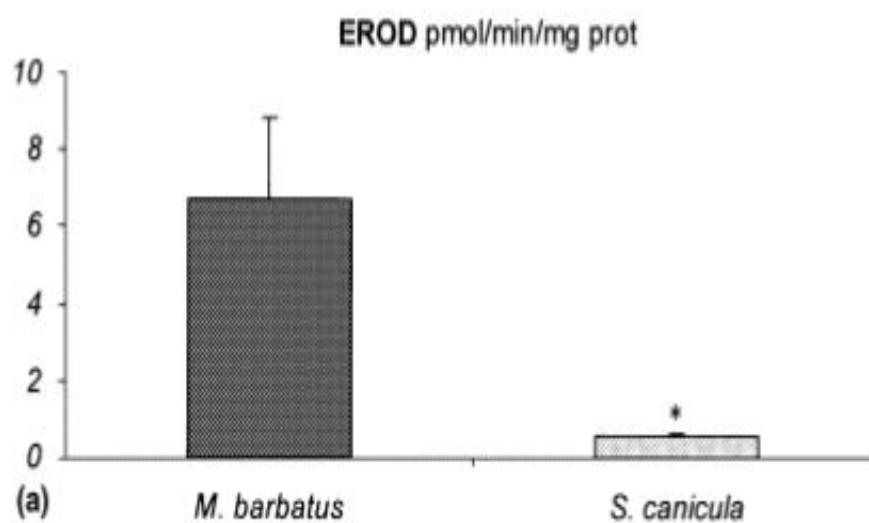


Figura 15. Actividad de EROD en *M.barbatus* y *S.canicula* (valores medios \pm SD, n 14 10). El asterisco indica diferencias significativas entre *M.barbatus* y *S.canicula* ($p < 0.05$) (106).

Estos datos coinciden con los obtenidos por Solé *et al.* (21), quienes también estimaron la actividad de la EROD mucho más baja en *S. canicula* que en otras especies de teleósteos, como puede observarse en la figura 16.

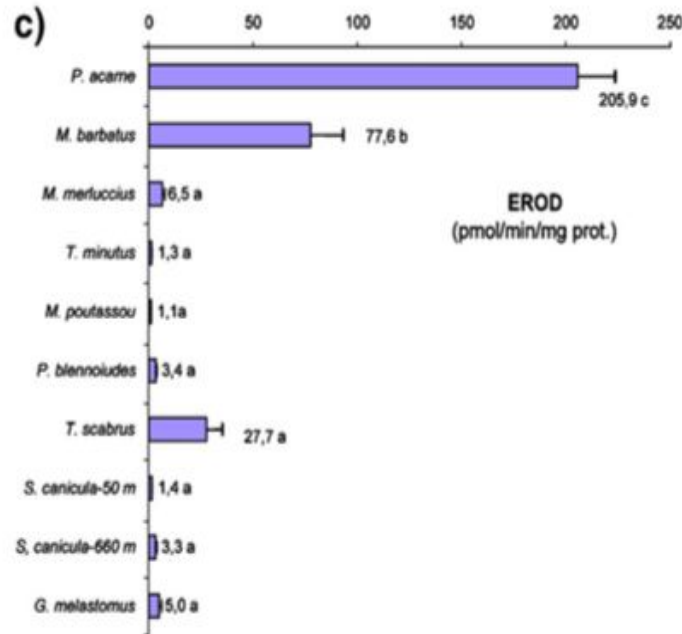


Figura 16. Actividad de la enzima antioxidante etoxirresorufina O-deetilasa (EROD) en diferentes especies de peces con interés comercial del Mediterráneo noroccidental (21).

Sin embargo, a pesar de que parece existir una tendencia general que muestra mayor actividad enzimática en teleósteos que en elasmobranquios (177), el grado de inducción de la actividad catalítica del CYP1A (EROD) fue considerado similar por Solé *et al.* (21) en ambos grupos de peces.

Por otra parte, Solé *et al.* (32) encontraron una correlación positiva de EROD con el consumo de zooplancton en los ejemplares que habitan en la plataforma continental; sin embargo en el caso de los ejemplares que habitan fuera de la plataforma, la relación con las variables ecológicas y, en particular, con los componentes principales de la dieta (bentos, suprabentos, zooplancton) no fue tan clara (32). También estableció una correlación negativa entre EROD y el nivel trófico (21), por lo que los organismos que pertenecen a un nivel trófico más alto tendrán niveles de EROD más bajos que organismos de niveles tróficos inferiores.

5.1.2. Glutación S-transferasa (GST)

Otro de los biomarcadores más utilizados en *S. canicula*, en los estudios de los artículos seleccionados, es la glutatión S-transferasa (GST). Al igual que pasa con EROD, los niveles de GST de *S. canicula* fueron significativamente menores ($p < 0.05$) que en *Mullus barbatus* (106), tal y como puede observarse en la figura 17.

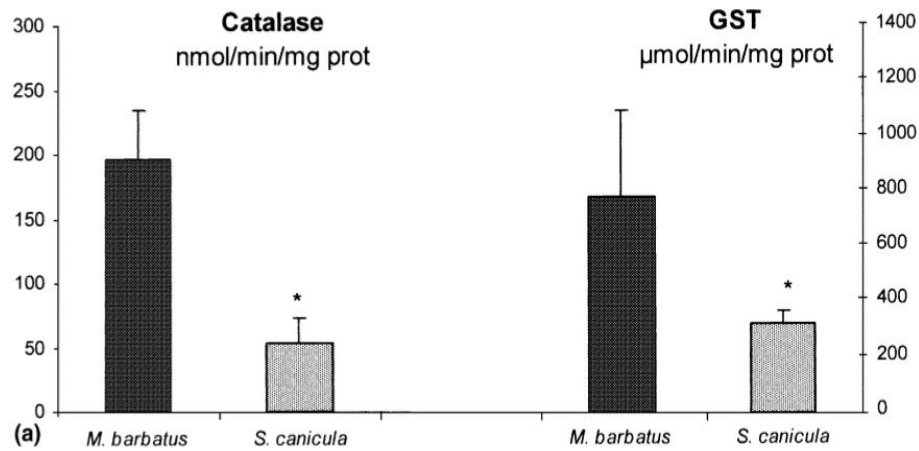


Figura 17. Actividad de catalasa y glutatión S-transferasas en *M. barbatus* y *S. canicula* (valores medios \pm SD n 1/4 10). Los asteriscos indican diferencias significativas entre *M. barbatus* y *S. canicula* ($p < 0.05$) (106).

Por otra parte, cabe destacar que, al realizar una comparativa entre los tiburones *Galeus melastomus* (alimentador pelágico) y *Scyliorhinus canicula* (principalmente alimentador bentónico), la actividad enzimática fue mayor en *S. canicula* que en *G. melastomus*, como se puede observar en la figura 18.

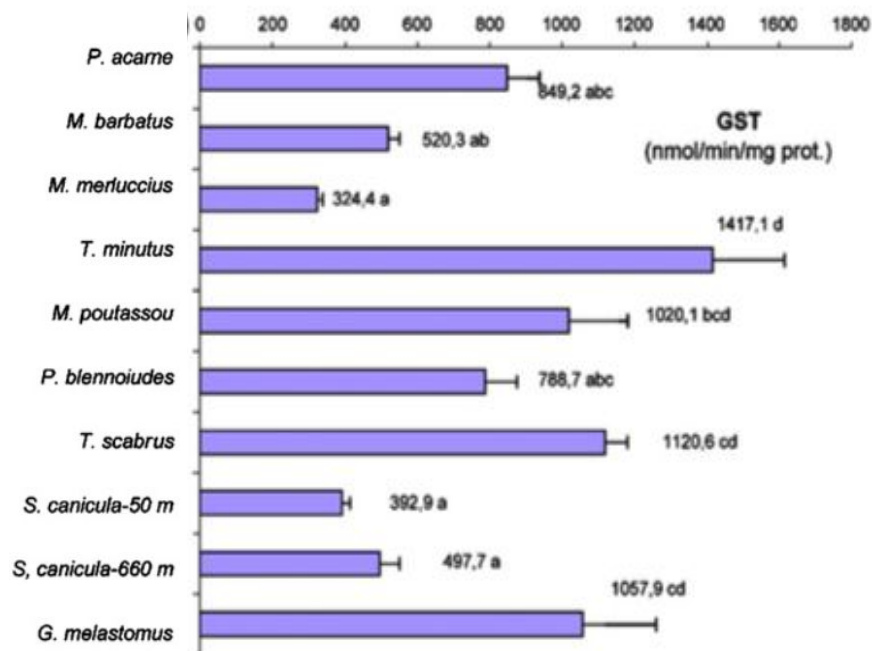


Figura 18. Actividad de la enzima antioxidante glutatión S-transferasa (GST) en varias especies de peces comerciales del Mediterráneo noroccidental (32).

En lo que respecta a las diferentes correlaciones de GST en la bibliografía consultada, encontramos que Solé *et al.* (32) obtuvo una correlación positiva entre la natación y GST tanto en ejemplares que habitan en la zona de la plataforma continental, como en los que

habitan fuera de ella. Además, estos últimos tienen una correlación positiva con el consumo de zooplancton y una negativa con el consumo de organismos del bentos (32).

Por último, cabe destacar la correlación positiva hallada entre GST y el nivel trófico, de manera que los grandes depredadores presentan una actividad de la EROD más alta. Esto parece demostrar que los grandes depredadores están mejor adaptados a la presencia de compuestos xenobióticos (21).

5.1.3. Catalasa (CAT)

El bioindicador catalasa (CAT) aparece en 3 de los 8 artículos seleccionados, en los que se ha trabajado con la especie *S.canicula*. Resultados previos sobre la catalasa (178) confirman que el contenido de enzimas antioxidantes en elasmobranquios es reducido en comparación con las especies de teleósteos. En la figura 17 se muestra como los niveles de CAT de *S.canicula* fueron significativamente menores que la actividades de CAT en *M.barbatus* (106).

En la figura 19 se muestra una comparación de la actividad CAT entre diferentes especies de elasmobranquios y teleósteos.

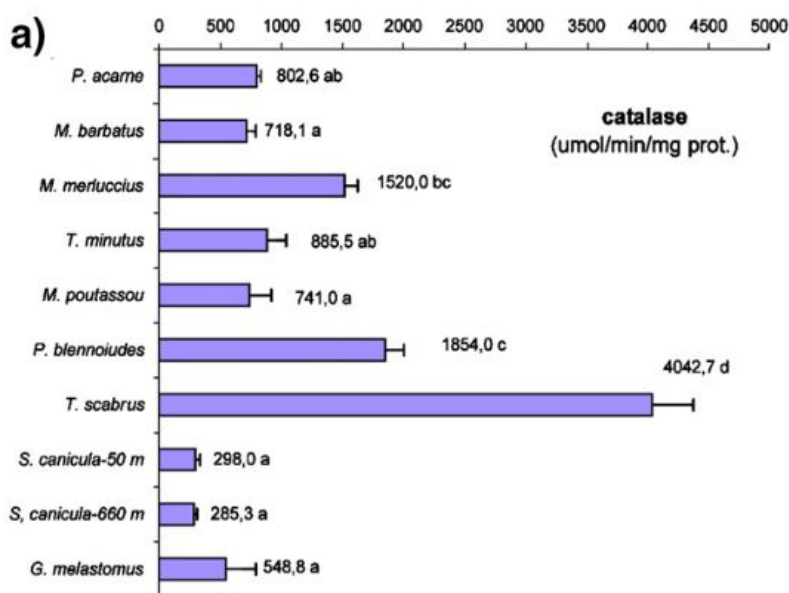


Figura 19. Actividad de la enzima catalasa (CAT) en varias especies de peces comerciales del Mediterráneo noroccidental (21).

Por otra parte, según Solé *et al.* (32), CAT tiene una correlación negativa con la natación, y una correlación positiva con el nivel trófico, de manera que los depredadores primarios tienden a expresar una mayor actividad CAT. Esto parece demostrar que los depredadores principales están mejor adaptados a la presencia de compuestos xenobióticos (21).

5.1.4. Metalotioneína (MT)

La metalotioneína es 1 de los biomarcadores más utilizados para metales pesados y, como se puede observar en la figura 20, los niveles de metalotioneínas medidos en *Scyliorhinus canicula* no mostraron diferencias significativas en comparación con los medidos en *M. barbatus* (106).

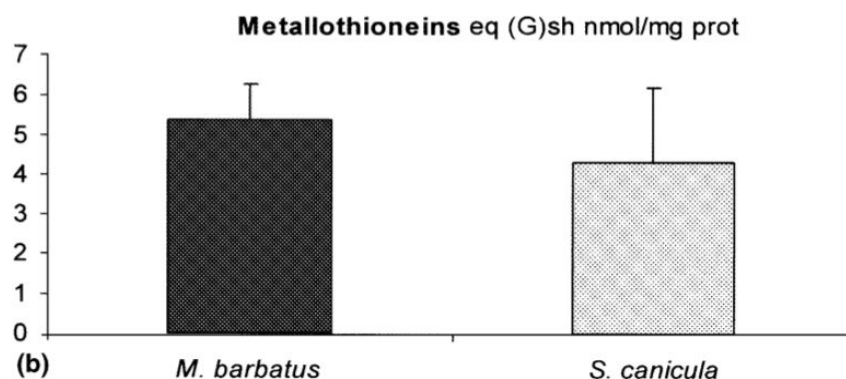


Figura 20. Actividad de las metalotioneínas en *M. barbatus* y *S. canicula* (valores medios \pm SD n 1/4 10). Los asteriscos indican diferencias significativas entre *M. barbatus* y *S. canicula* ($p < 0.05$) (106).

Pero la inducción de metalotioneína no parece funcionar siempre con todos los metales. Por ejemplo, De Boeck *et al.* (52) realizó un experimento en el que exponía ejemplares de *S. canicula* a distintos metales pesados (níquel, cadmio, plomo, plata y cobre), pero sólo se produjo la inducción de metalotioneína en los peces expuestos a cobre (Cu). La inducción se produjo tanto en las branquias como en el tejido hepático (figura 21). Ninguna de las exposiciones a los otros metales estudiados produjo una inducción significativa ($p < 0.05$) de MT.

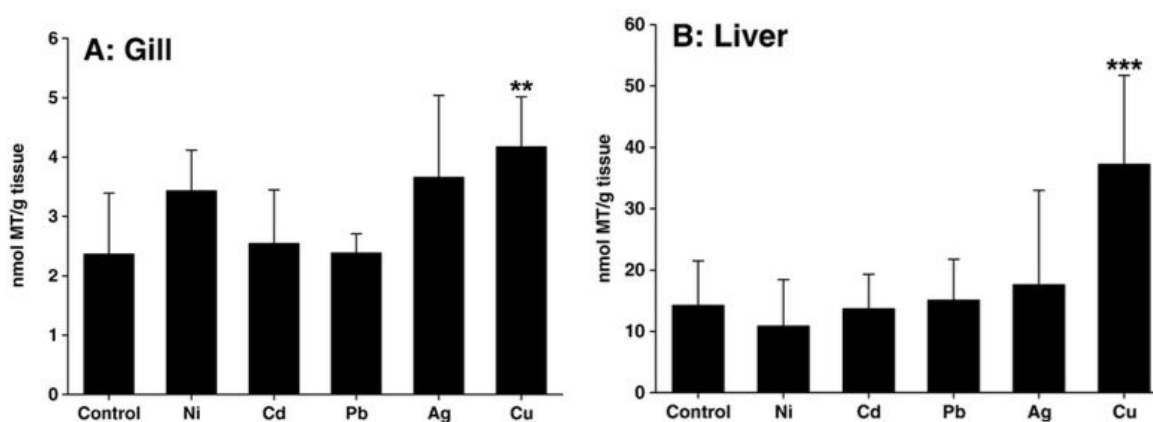


Figura 21. Niveles de metalotioneína en tejido branquial (A) y del tejido hígado (B) de *Scyliorhinus canicula* tras una semana en condiciones control y en condiciones de exposición a niveles subletales de Ni (587 $\mu\text{g/L}$), Cd (1124 $\mu\text{g/L}$), Pb (2072 $\mu\text{g/L}$), Ag (10 $\mu\text{g/L}$) y Cu (635 $\mu\text{g/L}$) (N = 6, Media \pm SD, **: $P < 0.01$) ($P < 0.05$) (52).

5.1.5. Carboxilesterasas

Las carboxilesterasas (CbE) se han utilizado en 2 de los 8 artículos encontrados. En el artículo de Nos *et al.* (36) se han estudiado diferentes especies de condrictios, pudiéndose medir la actividad de la CbE en la mayoría de ellas.

Por otra parte, Solé *et al.* (32) obtuvieron niveles de CbE significativamente menores ($p < 0.05$) en las especies que habitan en la plataforma continental, en comparación con las que viven fuera de ella. Y encontraron una correlación positiva entre la CbE y el consumo de organismos bentónicos (32).

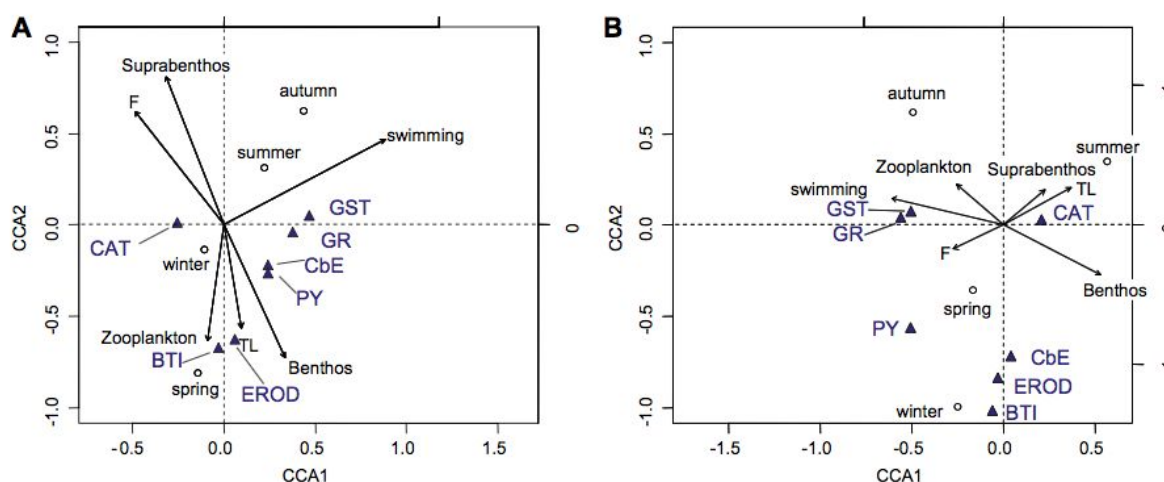


Figura 22. Análisis de Correspondencia Canónica (CCA) de biomarcadores de contaminantes orgánicos contra las estaciones y las variables ecológicas (nivel trófico-TL, natación, plenitud-F y tipo de dieta y código de crucero). A) peces de la plataforma continental y B) peces del talud. Todas las relaciones son significativas ($p < 0.05$) (32).

5.2. Grupos zoológicos de interés en el estudio de biomarcadores

5.2.1. Teleósteos

Algunos teleósteos son considerados especies centinela adecuadas para el estudio de biomarcadores, ya que en muchos casos los niveles de EROD son superiores en teleósteos que en elasmobranquios (21). Sin embargo, las diferentes especies de teleósteos muestran una variabilidad considerable en el patrón de exposición a los contaminantes y la respuesta biológica resultante (155). Es por ello que se debe realizar una correcta selección de la especie de teleósteo a utilizar para que resulte adecuada como centinela (179-182).

Según Solé *et al.* (21) las dos especies de teleósteos con niveles de EROD más altos son *Pagellus acarne* (206 ± 18) and *Mullus barbatus* (77.6 ± 16), y las especies con los niveles más bajos son *Merluccius merluccius* (6.5 ± 1.2).

En lo que respecta a los niveles de GST las actividades más altas se observaron en *Trachyglanis minutus* y fueron 7.5 veces mayores que en *Citharus linguatula* (la especie con la actividad de GST más baja) según Solé *et al.* (32). Pero Solé *et al.* (21) obtuvo niveles bajos de GST en *M. barbatus* (~ 500 nmol/min/mg prot) y los niveles más bajos en *M. merluccius* (324.4 nmol/min/mg prot).

Solé *et al.* (21) observó una relación entre los dos antioxidantes CAT y GR cuando todos los teleósteos se consideraron como un grupo, aunque fue más evidente en los elasmobranquios ($r = 0.63$; $p < 0.05$). Pero otros autores como Santana *et al.* (125) concluyen que CAT es un biomarcador inadecuado para evaluar y comprender la exposición de los PAH en teleósteos, ya que no se observó una respuesta significativa, ni general, ni relativa, a los enfoques experimentales.

Otro de los biomarcadores más utilizados con teleósteos es la metalotioneína (MT). Bebianno *et al.* (159) observó que en *Aphanopus carbo*, MT variaba según el tamaño en los diferentes tejidos. Los niveles de MT en las branquias y el músculo fueron similares y significativamente más bajos que en el hígado ($p < 0.05$) y disminuyen con el tamaño/longitud mientras que aumenta en el hígado ($p < 0.05$) (figura 23). En los ejemplares de *A. carbo* más pequeños (50–75 cm), la MT disminuye según la secuencia: branquias > músculo > hígado. En muestras cuyo tamaño varía de 75 a 100 cm, la MT es mayor en el músculo, seguido del hígado y luego en las branquias, mientras que en las otras dos clases (100–125 y 125–150 cm), generalmente utilizadas para el consumo humano, la MT es significativamente más alta en el hígado ($p < 0.05$) y similar entre las branquias y los músculos ($p > 0.05$) (160).

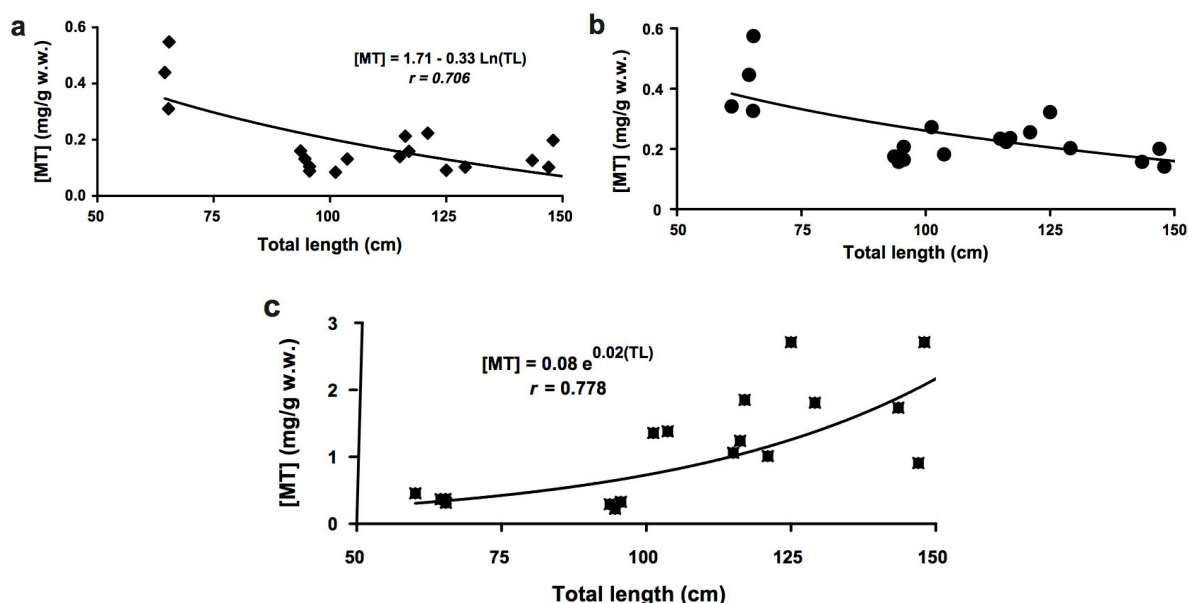


Figura 23. Concentraciones de MT (mg g⁻¹ w.w.) en función de la longitud total (cm) en diferentes tejidos: branquias (a), músculo (b) e hígado (c) del pez sable negro *A. carbo* (160).

5.2.2. Moluscos

El biomarcador más utilizado en los artículos seleccionados en los que aparecen moluscos es la GST. Numerosos estudios en moluscos bivalvos demuestran la variación de la actividad de GST cuando estos están expuestos a varios compuestos xenobióticos (183). Braga *et al.* (161) por ejemplo observó que se producían variaciones significativas de las actividades enzimáticas al exponer a los organismos a las diferentes concentraciones de aceite diesel, pero ninguna difirió considerablemente del tratamiento de control, excepto la actividad GST. Los niveles de EROD también varían significativamente al exponer a los moluscos a diferentes concentraciones de compuestos “dioxin-like” (137).

Además, GST también se utiliza con metales, Marqués *et al.* (121) obtuvo una correlación positiva entre la concentración de Cd y Pb en las branquias con GST, GR y LPO. Aún así, según Perić *et al.* (148) solo obtuvo un aumento significativo de GST cuando se exponía a los organismo solo a Cu.

Otro biomarcador que se utiliza con metales en moluscos es la metalotioneína (MT), y al contrario que con GST, Perić *et al.* (148) observó que el contenido de MT fue significativamente mayor que el control cuando los mejillones se expusieron a clorpirifos (Chp) solo a una concentración más baja (0,05 mg L⁻¹), mientras que no se pudo observar

efecto para el Cu a ambas concentraciones analizadas. No hubo efecto en el contenido de MT de ninguna de las cuatro combinaciones de Chp y Cu.

5.2.3. Elasmobranquios

El biomarcador más utilizado entre los elasmobranquios en los artículos seleccionados es la metalotioneína MT, la cual se utiliza con metales. Como se ha comentado en el apartado de biomarcadores utilizados en *S.canicula* al contrario de lo que pasa con la actividad de EROD donde se puede observar (figura 15) que en los elasmobranquios es hasta un orden de magnitud menor que en *M. barbatus* (106), los niveles de MT de los elasmobranquios y los teleósteos no muestran una diferencia significativa (figura 20)(106).

Pero aunque las metalotioneínas son biomarcadores muy utilizados, en algunos artículos no se obtienen correlaciones entre las concentraciones de metales y la actividad de proteína^o. Es el caso del estudio realizado por Walker (33), quien no consiguió establecer una correlación entre las MTs y el Hg.

En lo que respecta a la actividad de EROD hay que tener en cuenta que cambia según la especie se utiliza, por ejemplo Cullen *et al.* (23) observó que la actividad de EROD fue mayor en las *Sphyrna tiburo* que en *Carcharhinus leucas* y *Carcharhinus limbatus*, mientras que la actividad de GST fue significativamente mayor en los *C.limbatus* y en los *S.tiburo* que en los *C.leucas*.

5.2.4. Crustáceos

El biomarcador más utilizado en crustáceos según los artículos seleccionados en los que aparecen crustáceos es la GST. Este biomarcador es utilizado tanto para medir POPs como para medir metales. En este sentido, Tsangaris *et al.* (119) observó, en *Liocarcinus depurator*, una respuesta de GST y, en menor medida, de CAT a la descarga de desechos metalíferos con las concentraciones de tejido metálico. Estos resultados sugieren una utilidad potencial para evaluar los efectos de la exposición al metal. Otro biomarcador utilizado con *L.depurator* es AChE, el cual no respondió a la exposición al metales (119).

Duarte *et al.* (149) obtuvo resultados que indican que existen correlaciones positivas significativas entre los biomarcadores de efecto tanto en *Carcinus maenas* ($r = 0.28$, $P < 0.05$) como en *Crangon crangon* ($r = 0.37$, $P < 0.01$). También se observaron correlaciones positivas entre la actividad de SOD y LPO en *C. maenas* ($r = 0,53$, $P < 0.001$), mientras que

en *C. maenas*, la actividad GST se correlacionó negativamente con DNAd ($r = -0.47$, $P < 0.001$), CAT ($r = -0.33$, $P < 0.05$) y con actividad EROD ($r = -0.30$, $P < 0.05$) (149).

5.2.5. Reptiles marinos (tortugas)

Las metalotioneínas son el biomarcador más utilizado en reptiles marinos. Andreani *et al.* (127) encontró correlaciones positivas entre las concentraciones de Cu y Cd y Cu-MT y Cd-MT en el hígado y el riñón de dos especies de tortugas, *Caretta caretta* y *Chelonia mydas*. Las concentraciones de MT fueron más altas *C. mydas* que en *C. caretta*.

Además, al contrario de lo que sucede en otros grupos de organismos, la cuantificación de metales y MT en hígado y riñón puede ser un biomarcador válido de exposición a metales en el medio ambiente acuático para evaluar la salud de las tortugas marinas.

5.2.6. Mamíferos marinos

Los mamíferos marinos aparecen en uno de los artículos seleccionados donde evalúan biomarcadores involucrados en el metabolismo que compuestos xenobióticos, GST, GR, GPx, SOD y EROD/GST (BTI). Pero solo la actividad de GST varió con los niveles de POP, y los mejores modelos indicaron que la actividad de GST se asoció positivamente con la concentración de DDTs.

5.2.7. Anélidos

Duarte *et al.* (149) observaron valores significativos de actividad de enzimas antioxidantes en *Nereis diversicolor* ($F > 4.52$, $P < 0.05$), con la excepción del biomarcador SOD ($F = 0.896$, $P > 0.05$). Además se observó una correlación negativa entre la actividad de DNAd y GST ($r = -0.30$, $P < 0.05$) y la actividad de SOD se correlacionó positivamente con la actividad de la enzima de biotransformación GST en *N. diversicolor* ($r = 0.52$, $P < 0.001$).

5.2.8. Equinodermos

En el caso de los equinodermos, sólo la especie *Paracentrotus lividus* aparece en un artículo, en el cual se determinaron los niveles de Arsénico y se propusieron posibles biomarcadores para medir los niveles. El estudio reveló un alto nivel de As inorgánico (0.218 $\mu\text{g/g}$), que representa el porcentaje más alto de As inorgánico entre los distintos organismos utilizados en el estudio (6.7%).

6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos a partir de la revisión bibliográfica llevada a cabo para la realización del presente Trabajo Fin de Grado, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- El análisis realizado sobre la producción científica respecto a la evolución del uso de biomarcadores, pone de manifiesto que el número de artículos publicado ha aumentado considerablemente en los dos últimos años del periodo estudiado, llegando a duplicarse en 2018 con respecto a los años anteriores.
- Se ha realizado una clasificación de los principales grupos zoológicos en los que se han analizado los principales biomarcadores. Los grupos más utilizados son teleósteos, moluscos y elasmobranquios, en 29, 23 y 22 artículos de los seleccionados, respectivamente. En menor proporción también se utilizan crustáceos, reptiles marinos (tortugas), mamíferos marinos, anélidos y equinodermos.
- Los biomarcadores más utilizados en el elasmobranquio *Scyliorhinus canicula* son EROD, GST, CAT, MT, CbE.
- Los biomarcadores más utilizados en los distintos grupos zoológicos y que, según la bibliografía consultada, no se han ensayado en *Scyliorhinus canicula* son ALA-D, SOD, LPO, AChE, GR y GPx. Por ello, se propone investigar su utilización como potenciales biomarcadores en *Scyliorhinus canicula*.

7. LÍNEAS FUTURAS

A partir del estudio bibliográfico llevado a cabo para este Trabajo Fin de Grado, se pueden plantear las siguientes líneas de investigación:

- Análisis de biomarcadores GST, EROD, CAT, MT, CbE en *Scyliorhinus canicula*.
- Análisis de biomarcadores ALA-D, SOD, LPO, AChE, GR y GPx en *Scyliorhinus canicula*.
- Análisis de metalotioneína (MT) como biomarcador de metales pesados (Cu, Cd, Hg, Zn) en *Scyliorhinus canicula*.
- Revisión bibliográfica de los biomarcadores genéticos en *Scyliorhinus canicula*.
- Análisis de biomarcadores genéticos en *Scyliorhinus canicula*.

8. REFERENCIAS

1. Armitage J, Quinn C, Wania F. Global climate change and contaminants—an overview of opportunities and priorities for modelling the potential implications for long-term human exposure to organic compounds in the Arctic. *Journal of Environmental Monitoring*. 2011;13(6):1532.
2. Murray R K, Bender D A, Botham K M, Kennelly P J, Rodwell V W. Weil P A. Harper: bioquímica ilustrada. McGraw-Hill. 2010.
3. López Carrascosa J, Modrego A. La biotecnología y su aplicación industrial en España. 1994.
4. Escobar J. La contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar. United Nations Publications. 2002; 50.
5. Ruivo M. La Contaminación del Mar y los Recursos Vivos, Prólogo del libro que contiene las contribuciones, resúmenes y discusiones de la Conferencia sobre Contaminación Marina y sus efectos en los Recursos Marinos Vivos. FAO. 1971.
6. Cocci P, Mosconi G, Bracchetti L, Nalocca J, Frapiccini E, Marini M et al. Investigating the potential impact of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on gene biomarker expression and global DNA methylation in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) from the Adriatic Sea. *Science of The Total Environment*. 2018;619-620:49-57.
7. Ansari T, Marr I, Tariq N. Heavy Metals in Marine Pollution Perspective—A Mini Review. *Journal of Applied Sciences*. 2004;4(1):1-20.
8. Páez-Osuna F. Efectos de los metales. Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. 1996;349-361.

9. Storelli M, Marcotrigiano G. Persistent organochlorine residues and toxic evaluation of polychlorinated biphenyls in sharks from the Mediterranean Sea (Italy). *Marine Pollution Bulletin*. 2001;42(12):1323-1329.
10. Gelsleichter J. y Walker C J. Pollutant exposure and effects in sharks and their relatives. In *Sharks and Their Relatives II*. CRC Press. 2010: 507-554.
11. Battaglini P, Andreozzi G, Antonucci R, Arcamone N, De Girolamo P, Ferrara L et al. The effects of cadmium on the gills of the goldfish *Carassius auratus L.*: Metal uptake and histochemical changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1993;104(2):239-247.
12. Thophon S, Pokethitiyook P, Chalermwat K, Upatham E, Sahaphong S. Ultrastructural alterations in the liver and kidney of white sea bass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Toxicology*. 2004;19(1):11-19.
13. Cross J, Jo Ellen H. Evidence for impaired reproduction in white croaker (*Genyonemus lineatus*) from contaminated areas off Southern California. *Marine Environmental Research*. 1988;24(1-4):185-188.
14. Hose J, Cross J, Smith S, Diehl D. Reproductive impairment in a fish inhabiting a contaminated coastal environment off Southern California. *Environmental Pollution*. 1989;57(2):139-148.
15. Lahvis G, Wells R, Kuehl D, Stewart J, Rhinehart H, Via C. Decreased lymphocyte responses in free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) are associated with increased concentrations of PCBs and DDT in peripheral blood. *Environmental Health Perspectives*. 1995;103(suppl 4):67-72.
16. Jepson P, Bennett P, Deaville R, Allchin C, Baker J, Law R. Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded in the united kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2005;24(1):238.

17. Ylitalo G, Stein J, Hom T, Johnson L, Tilbury K, Hall A et al. The role of organochlorines in cancer-associated mortality in California sea lions (*Zalophus californianus*). *Marine Pollution Bulletin*. 2005;50(1):30-39.
18. Gelsleichter J, Walsh C, Szabo N, Rasmussen L. Organochlorine concentrations, reproductive physiology, and immune function in unique populations of freshwater Atlantic stingrays (*Dasyatis sabina*) from Florida's St. Johns River. *Chemosphere*. 2006;63(9):1506-1522.
19. Boldrocchi G, Monticelli D, Omar Y, Bettinetti R. Trace elements and POPs in two commercial shark species from Djibouti: Implications for human exposure. *Science of The Total Environment*. 2019;669:637-648.
20. Letcher R, Bustnes J, Dietz R, Jenssen B, Jørgensen E, Sonne C et al. Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish. *Science of The Total Environment*. 2010;408(15):2995-3043.
21. Solé M, Rodríguez S, Papiol V, Maynou F, Cartes J. Xenobiotic metabolism markers in marine fish with different trophic strategies and their relationship to ecological variables. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2009;149(1):83-89.
22. Maldonado A, Alonso B. Concentraciones de metales pesados y mecanismos de dispersión en tres sectores de la plataforma continental del Mediterráneo español. 1983.
23. Cullen J, Marshall C, Hala D. Integration of multi-tissue PAH and PCB burdens with biomarker activity in three coastal shark species from the northwestern Gulf of Mexico. *Science of The Total Environment*. 2019;650:1158-1172.
24. Stevens J, Brown B. Occurrence of heavy metals in the blue shark *Prionace glauca* and selected pelagic in the N. E. Atlantic Ocean. *Marine Biology*. 1974;26(4):287-293.

25. Perugini M, Visciano P, Giammarino A, Manera M, Di Nardo W, Amorena M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine organisms from the Adriatic Sea, Italy. *Chemosphere*. 2007;66(10):1904-1910.
26. Bosch A, O'Neill B, Sigge G, Kerwath S, Hoffman L. Heavy metals in marine fish meat and consumer health: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2015;96(1):32-48.
27. Albaigés J. Persistent Organic Pollutants in the Mediterranean Sea. *The Mediterranean Sea*. 2005;89-149.
28. Porte C, Albaigés J. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans, and fishes. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1994;26(3).
29. Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe J, Burgeot T, Bellocq J. Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. *Marine Pollution Bulletin*. 1998;36(12):951-960.
30. Bucheli T, Fent K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 1995;25(3):201-268.
31. Capó Martí M. Principios de ecotoxicología. Editorial Tébar. 2011.
32. Solé M, Antó M, Baena M, Carrasson M, Cartes J, Maynou F. Hepatic biomarkers of xenobiotic metabolism in eighteen marine fish from NW Mediterranean shelf and slope waters in relation to some of their biological and ecological variables. *Marine Environmental Research*. 2010;70(2):181-188.
33. Walker, C J. Assessing the Effects of Pollutant Exposure on Sharks: A Biomarker Approach. *UNF Graduate Theses and Dissertations*. 2011;141.

34. Walker C, Gelsleichter J, Adams D, Manire C. Evaluation of the use of metallothionein as a biomarker for detecting physiological responses to mercury exposure in the bonnethead, *Sphyrna tiburo*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2014;40(5):1361-1371.
35. Fernández B, Martínez-Gómez C, Benedicto J. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity (ALA-D) in red mullet (*Mullus barbatus*) from Mediterranean waters as biomarker of lead exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2015;115:209-216.
36. Nos D, Navarro J, Barría C, Solé M. Carboxylesterase activities in chondrichthyans of the western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 2017;119(1):332-335.
37. Duarte B, Carreiras J, Pérez-Romero J, Mateos-Naranjo E, Redondo-Gómez S, Matos A et al. Halophyte fatty acids as biomarkers of anthropogenic-driven contamination in Mediterranean marshes: Sentinel species survey and development of an integrated biomarker response (IBR) index. *Ecological Indicators*. 2018;87:86-96.
38. Delahaut V, Daelemans O, Sinha A, De Boeck G, Bervoets L. A multibiomarker approach for evaluating environmental contamination: Common carp (*Cyprinus carpio*) transplanted along a gradient of metal pollution. *Science of The Total Environment*. 2019;669:481-492.
39. Bouraoui Z, Banni M, Chouba L, Ghedira J, Clerandau C, Jebali J et al. Monitoring pollution in Tunisian coasts using a scale of classification based on biochemical markers in worms *Nereis (Hediste) diversicolor*. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2009;164(1-4):691-700.
40. Marigómez I, Garmendia L, Soto M, Orbea A, Izagirre U, Cajarville M. Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill "Mussel Watch". *Ecotoxicology*. 2013;22(3):486-505.

41. Saraiva A, Costa J, Eiras J, Cruz C. Histological study as indicator of juveniles farmed turbot, *Scophthalmus maximus* L. health status. Aquaculture. 2016;459:210-215.
42. Hylland K, Robinson C, Burgeot T, Martínez-Gómez C, Lang T, Svavarsson J et al. Integrated chemical and biological assessment of contaminant impacts in selected European coastal and offshore marine areas. Marine Environmental Research. 2017;124:130-138.
43. Wu R, Siu W, Shin P. Induction, adaptation and recovery of biological responses: Implications for environmental monitoring. Marine Pollution Bulletin. 2005;51(8-12):623-634.
44. Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A. The use of biomarkers in biomonitoring: A 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology. 2007;146(3):281-300.
45. Melacon M. Bioindicators used in aquatic and terrestrial monitoring. Handbook of Ecotoxicology. 1995;755.
46. Depledge M, Aagaard A, Györkös P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. Marine Pollution Bulletin. 1995;31(1-3):19-27.
47. Livingstone D. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2007;57(3):195-211.
48. Reyes, R. Las metalotioninas como biomarcadores de la contaminación ambiental por metales pesados en organismos acuáticos. Interciencia. 1999;24:366-37.
49. Strimbu K, Tavel J. What are biomarkers?. Current Opinion in HIV and AIDS. 2010;5(6):463-466.

50. Bozo L, Fernández M, López M, Reyes R, Suárez P. Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. *Interciencia*, 2007;32:8-13.
51. Company R, Felícia H, Serafim A, Almeida A, Biscoito M, Bebianno M. Metal concentrations and metallothionein-like protein levels in deep-sea fishes captured near hydrothermal vents in the Mid-Atlantic Ridge off Azores. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*. 2010;57(7):893-908.
52. De Boeck G, Eyckmans M, Lardon I, Bobbaers R, Sinha A, Blust R. Metal accumulation and metallothionein induction in the spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2010;155(4):503-508.
53. Hoffmayer E R, Parsons G R. The physiological response to capture and handling stress in the Atlantic sharpnose shark, *Rhizoprionodon terraenovae*. *Fish Physiology and Biochemistry*. 2001;25; 277.
54. Murray C, Connors R, O'Connor I, Dowling V. The physiological response and recovery of a common elasmobranch bycatch species: the lesser spotted dogfish (*Scyliorhinus canicula*) subject to a controlled exposure event. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*. 2015;115B(3):143.
55. Wilson S H, Suk W A. Overview and future of molecular biomarkers of exposure and early disease in environmental health. En Suk WA, Wilson SH (Eds.) *Biomarkers of Environmentally Associated Disease: Technologies, Concepts, and Perspectives*. CRC. 2002; 368.
56. De Acevedo F y da Mata A. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. 2003:340.
57. Suk WA, Wilson SH. Overview and future of molecular biomarkers of exposure and early disease in environmental health. En Suk WA, Wilson SH (Eds.) *Biomarkers of Environmentally Associated Disease: Technologies, Concepts, and Perspectives*. 2002; 368.

58. Whyte J, Jung R, Schmitt C, Tillitt D. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish as a Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology*. 2000;30(4):347-570.
59. Egaas E. Strain- and sex-specific differences in the glutathione S-transferase class pi in the mouse examined by gradient elution of the glutathione-affinity matrix and reverse-phase high performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. 1995;1243(2):256-264.
60. Halliwell B, Gutteridge J. Free radicals in biology and medicine. *Journal of Free Radicals in Biology & Medicine*. 1985;1(4):331-332.
61. Livingstone D. Contaminant-stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Marine Pollution Bulletin*. 2001;42(8):656-666.
62. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin M, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007;39(1):44-84.
63. Richardson B, Mak E, De Luca-Abbott S, Martin M, McClellan K, Lam P. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses?. *Marine Pollution Bulletin*. 2008;57(6-12):503-514.
64. Alves L, Nunes M, Marchand P, Le Bizec B, Mendes S, Correia J et al. Blue sharks (*Prionace glauca*) as bioindicators of pollution and health in the Atlantic Ocean: Contamination levels and biochemical stress responses. *Science of The Total Environment*. 2016;563-564:282-292.
65. Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2003;13(2):57-149.

66. Stegeman J J, Brouwer M, Richard T D G, Förlin L, Fowler B A, Sanders BM, van Veld P A.. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect. In: Huggett, R.J., Kimerly, R.A., Mehrle, P.M., Jr, Bergman, H.L. (Eds.), *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological markers of Anthropogenic Stress*. 1992: 235 /335.
67. Fridovich I. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry*. 1975;44(1):147-159.
68. Filho W D. Fish antioxidant defenses: a comparative approach. *Journal of Medical and Biological Research*. 1996.
69. Worthington D, Rosemeyer M. Human Glutathione Reductase: Purification of the Crystalline Enzyme from Erythrocytes. *European Journal of Biochemistry*. 1974;48(1):167-177.
70. Lange A, Ausseil O, Segner H. Alterations of tissue glutathione levels and metallothionein mRNA in rainbow trout during single and combined exposure to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2002;131(3):231-243.
71. Olsvik P, Kristensen T, Waagbø R, Rosseland B, Tollefsen K, Baeverfjord G et al. mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2005;141(3):314-323.
72. Carney Almroth B, Albertsson E, Sturve J, Förlin L. Oxidative stress, evident in antioxidant defences and damage products, in rainbow trout caged outside a sewage treatment plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008;70(3):370-378.
73. Commandeur JNM, Stijntjes GJ, Vermeulen NPE. Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. *Pharmacol*. 1995;47:271-330.

74. Boon J, Everaarts J, Hillebrand M, Eggens M, Pijnenburg J, Goksøyr A. Changes in levels of hepatic biotransformation enzymes and haemoglobin levels in female plaice (*Pleuronectes platessa*) after oral administration of a technical polychlorinated biphenyl mixture (Clophen A40). *Science of The Total Environment*. 1992;114:113-133.
75. Jimenez, Braulio D., et al. Hepatic enzymes as biomarkers: Interpreting the effects of environmental, physiological and toxicological variables. 1990.
76. Oikari A, Jimenez B. Effects of hepatotoxicants on the induction of microsomal monooxygenase activity in sunfish liver by β -naphthoflavone and benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1992;23(1):89-102.
77. Fair P. Interaction of benzo(a)pyrene and cadmium on GSH-S-transferase and benzo(a)pyrene hydroxylase in the black sea bass *Centropristis striata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1986;15(3):257-263.
78. Listowsky I, Abramovitz M, Homma H, Niitsu Y. Intracellular Binding and Transport of Hormones and Xenobiotics by GlutathioneS-Transferases. *Drug Metabolism Reviews*. 1988;19(3-4):305-318.
79. Barycki J, Colman R. Identification of the Non substrate Steroid Binding Site of Rat Liver GlutathioneS-Transferase, Isozyme 1-1, by the Steroid Affinity Label, 3 β -(Iodoacetoxy) dehydroisoandrosterone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1997;345(1):16-31.
80. Sheehan D, Meade G, Foley V, Dowd C. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochemical Journal*. 2001;360(1):1.
81. Heier L, Lien I, Strømseng A, Ljønes M, Rosseland B, Tollefsen K et al. Speciation of lead, copper, zinc and antimony in water draining a shooting range—Time dependant metal accumulation and biomarker responses in brown trout (*Salmo trutta* L.). *Science of The Total Environment*. 2009;407(13):4047-4055.

82. Kagi J H R, Nordberg M. Metallothionein. Proceedings of the First International Meeting on Metallothionein and other Low Molecular Weight Metal-binding Proteins. Birkhauser Verlag, Basel. 1979.
83. Kagi J H R, Vallee B L. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. J. biol. Chem. 1960; 235.
84. Morcillo P, Esteban M, Cuesta A. Heavy metals produce toxicity, oxidative stress and apoptosis in the marine teleost fish SAF-1 cell line. Chemosphere. 2016;144:225-233.
85. Ruttkay-Nedecky B, Nejdl L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T et al. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. International Journal of Molecular Sciences. 2013;14(3):6044-6066.
86. Cortés-Gómez A, Morcillo P, Guardiola F, Espinosa C, Esteban M, Cuesta A et al. Molecular oxidative stress markers in olive ridley turtles (*Lepidochelys olivacea*) and their relation to metal concentrations in wild populations. Environmental Pollution. 2018;233:156-167.
87. Granick S, Sassa S, Granick J, Levere R, Kappas A. Assays for Porphyrins, -Aminolevulinic-Acid Dehydratase, and Porphyrinogen Synthetase in Microliter Samples of Whole Blood: Applications to Metabolic Defects Involving the Heme Pathway. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1972;69(9):2381-2385.
88. Finelli V. Lead, zinc, and δ -aminolevulinate dehydratase. Biochemical Effects of Environmental Pollutants, Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, MI.1977: 351-364.
89. Kelada S. delta-Aminolevulinic Acid Dehydratase Genotype and Lead Toxicity: A Huge Review. American Journal of Epidemiology. 2001;154(1):1-13.
90. Hodson PV, Blunt BR, Whittle DM Monitoring lead exposure of fish. Advances in Environmental Science and Technology. 1984.

91. Burden V, Sandheinrich M, Caldwell C. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Environmental Pollution. 1998;101(2):285-289.
92. Schmitt C, Caldwell C, Olsen B, Serdar D, Coffey M. Environmental Monitoring and Assessment. 2002;77(1):99-119.
93. Hodson P, Blunt B, Spry D, Austen K. Evaluation of Erythrocyte δ -amino Levulinic Acid Dehydratase Activity as a Short-Term Indicator in Fish of a Harmful Exposure to Lead. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 1977;34(4):501-508.
94. Sirot V, Guérin T, Volatier J, Leblanc J. Dietary exposure and biomarkers of arsenic in consumers of fish and shellfish from France. Science of The Total Environment. 2009;407(6):1875-1885.
95. Solé M, Baena M, Arnau S, Carrasson M, Maynou F, Cartes J. Muscular cholinesterase activities and lipid peroxidation levels as biomarkers in several Mediterranean marine fish species and their relationship with ecological variables. Environment International. 2010;36(2):202-211.
96. Moschino V, Da Ros L. Biochemical and lysosomal biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Mar Piccolo of Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). Environmental Science and Pollution Research. 2015;23(13):12770-12776.
97. Hariharan G, Purvaja R, Robin R, Ramesh R. Evaluation of the multiple biomarkers on identification of the vulnerable coastal pollution hotspots. Environmental Science and Pollution Research. 2016;23(22):23281-23290.
98. Silva C, Novais S, Simões T, Caramalho M, Gravato C, Rodrigues M et al. Using biomarkers to address the impacts of pollution on limpets (*Patella depressa*) and their mechanisms to cope with stress. Ecological Indicators. 2018;95:1077-1086.
99. Aguilera C, Leija A, Torres M, Mendoza R. Assessment of Environmental Quality in the Tamaulipas Laguna Madre, Gulf of Mexico, by Integrated Biomarker Response

Using the Cross-Barred Venus Clam *Chione elevata*. Water, Air, & Soil Pollution. 2019;230(2).

100. Baum J, Worm B. Cascading top-down effects of changing oceanic predator abundances. *Journal of Animal Ecology*. 2009;78(4):699-714.
101. Escobar-Sánchez O, Galván-Magaña F, Rosíles-Martínez R. Biomagnification of Mercury and Selenium in Blue Shark *Prionace glauca* from the Pacific Ocean off Mexico. *Biological Trace Element Research*. 2011;144(1-3):550-559.
102. Safe S. Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Environmental Impact, Biochemical and Toxic Responses, and Implications for Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology*. 1994;24(2):87-149.
103. Ross P, De Swart R, Reijnders P, Van Loveren H, Vos J, Osterhaus A. Contaminant-related suppression of delayed-type hypersensitivity and antibody responses in harbor seals fed herring from the Baltic Sea. *Environmental Health Perspectives*. 1995;103(2):162-167.
104. Jones K, de Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*. 1999;100(1-3):209-221.
105. Valls E, Navarro J, Barría C, Coll M, Fernández-Borràs J, Rotllant G. Seasonal, ontogenetic and sexual changes in lipid metabolism of the small-spotted catshark (*Scyliorhinus canicula*) in deep-sea free-living conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2016;483:59-63.
106. Gorbi S, Pellegrini D, Tedesco S, Regoli F. Antioxidant efficiency and detoxification enzymes in spotted dogfish *Scyliorhinus canicula*. *Marine Environmental Research*. 2004;58(2-5):293-297.
107. Navarro J, Cardador L, Fernández Á, Bellido J, Coll M. Differences in the relative roles of environment, prey availability and human activity in the spatial distribution of two marine mesopredators living in highly exploited ecosystems. *Journal of Biogeography*. 2015;43(3):440-450.

108. Valls M, Quetglas A, Ordines F, Moranta J. Feeding ecology of demersal elasmobranchs from the shelf and slope off the Balearic Sea (western Mediterranean). *Scientia Marina*. 2011;75(4):633-639.
109. Capapé C, Mnasri-Sioudi N, El Kamel-Moutalibi O, Boumaïza M, Amor M, Reynaud C. Production, maturity, reproductive cycle and fecundity of small-spotted catshark, *Scyliorhinus canicula* (Chondrichthyes: Scyliorhinidae) from the northern coast of Tunisia (Central Mediterranean). *Journal of Ichthyology*. 2014;54(1):111-126.
110. Ellis J, Shackley S. The reproductive biology of *Scyliorhinus canicula* in the Bristol Channel, U.K. *Journal of Fish Biology*. 1997;51(2):361-372.
111. Olaso I, Velasco F, Pereda P, Perez N. ICES.C.M. Mini 2. 1996.
112. Sardà F, Coll M, Heymans J, Stergiou K. Overlooked impacts and challenges of the new European discard ban. *Fish and Fisheries*. 2013;16(1):175-180.
113. Vannuccini S. Shark utilization, marketing and trade/by stefania vannuccin. 1999; 338.
114. Borges L, Rogan E, Officer R. Discarding by the demersal fishery in the waters around Ireland. *Fisheries Research*. 2005;76(1):1-13.
115. ICES. Report of the working Group on elasmobranch fishes (WGEF). 2007.
116. Marine Institute. The Stock Book 2007. Annual review of fish stocks in 2007 with management advice for 2008. 2007.
117. Sims D, Nash J, Morritt D. Movements and activity of male and female dogfish in a tidal sea lough: alternative behavioural strategies and apparent sexual segregation. *Marine Biology*. 2001;139(6):1165-1175.

118. Kopecka-Pilarczyk J, Correia A. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2009;72(4):1296-1302.
119. Tsangaris C, Moschino V, Strogyloudi E, Coatu V, Ramšak A, Alhaija R et al. Erratum to: Biochemical biomarker responses to pollution in selected sentinel organisms across the Eastern Mediterranean and the Black Sea. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016;23(21):22222-22222.
120. Ji R, Pan L, Guo R, Zheng L, Zhang M. Using multi-integrated biomarker indexes approach to assess marine quality and health status of marine organism: a case study of *Ruditapes philippinarum* in Laizhou Bay, China. *Environmental Science and Pollution Research*. 2019;26(10):9916-9930.
121. Marques A, Piló D, Carvalho S, Araújo O, Guilherme S, Santos M et al. Metal bioaccumulation and oxidative stress profiles in *Ruditapes philippinarum* – insights towards its suitability as bioindicator of estuarine metal contamination. *Ecological Indicators*. 2018;95:1087-1099.
122. Bouzahouane H, Barour C, Sleimi N, Ouali K. Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *Stramonita haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere*. 2018;207:725-741.
123. Fuentes-Rios D, Orrego R, Rudolph A, Mendoza G, Gavilán J, Barra R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): Biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. *Chemosphere*. 2005;61(2):192-199.
124. Sabullah M K, Ahmad S. A, Shukor M Y, Gansau A J, Syed M A, Sulaiman M R, Shamaan N A. Heavy metal biomarker: Fish behavior, cellular alteration, enzymatic reaction and proteomics approaches. *International Food Research Journal*. 2015; 22(2).
125. Santana M, Sandrini-Neto L, Filipak Neto F, Oliveira Ribeiro C, Di Domenico M, Prodocimo M. Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2018;242:449-461.
126. Chan C, Wang W. Biomarker responses in oysters *Crassostrea hongkongensis* in relation to metal contamination patterns in the Pearl River Estuary, southern China. *Environmental Pollution*. 2019;251:264-276.
 127. Andreani G, Santoro M, Cottignoli S, Fabbri M, Carpenè E, Isani G. Metal distribution and metallothionein in loggerhead (*Caretta caretta*) and green (*Chelonia mydas*) sea turtles. *Science of The Total Environment*. 2008;390(1):287-294.
 128. Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A. Screening of POP pollution by AChE and EROD activities in Zebra mussels from the Italian Great Lakes. *Chemosphere*. 2005;61(8):1074-1082.
 129. Nikinmaa M. Bioindicators and Biomarkers. *An Introduction to Aquatic Toxicology*. 2014;:147-155.
 130. Hauser-Davis R, Lopes R, Ziolli R. Inhibition of mullet (*M. liza*) brain acetylcholinesterase activity by in vitro polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Marine Pollution Bulletin*. 2019;140:30-34.
 131. Chandurvelan R, Marsden I, Glover C, Gaw S. Assessment of a mussel as a metal bioindicator of coastal contamination: Relationships between metal bioaccumulation and multiple biomarker responses. *Science of The Total Environment*. 2015;511:663-675.
 132. Armstrong E, Miller A, Mondon J, Greenfield P, Stephenson S, Tan M et al. De Novo assembly and characterisation of the greentail prawn (*Metapenaeus bennettiae*) hepatopancreas transcriptome – identification of stress response and detoxification transcripts. *Marine Genomics*. 2019.
 133. Righetti B, Mattos J, Siebert M, Daura-Jorge F, Bezamat C, Fruet P et al. Biochemical and molecular biomarkers in integument biopsies of free-ranging coastal bottlenose dolphins from southern Brazil. *Chemosphere*. 2019;225:139-149.

134. Kovacik A, Tvrda E, Miskeje M, Arvay J, Tomka M, Zbynovska K et al. Trace Metals in the Freshwater Fish *Cyprinus carpio*: Effect to Serum Biochemistry and Oxidative Status Markers. *Biological Trace Element Research*. 2018;188(2):494-507.
135. Martínez-López E, Sousa A, María-Mojica P, Gómez-Ramírez P, Guilhermino L, García-Fernández A. Blood δ -ALAD, lead and cadmium concentrations in spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*) from Southeastern Spain and Northern Africa. *Ecotoxicology*. 2009;19(4):670-677.
136. Kalman J, Riba I, Blasco J, DelValls T. Is δ -aminolevulinic acid dehydratase activity in bivalves from south-west Iberian Peninsula a good biomarker of lead exposure?. *Marine Environmental Research*. 2008;66(1):38-40.
137. Sarkar A, Ray D, Shrivastava A, Sarker S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*. 2006;15(4):333-340.
138. Mearns A, Reish D, Bissell M, Morrison A, Rempel-Hester M, Arthur C et al. Effects of Pollution on Marine Organisms. *Water Environment Research*. 2018;90(10):1206-1300.
139. Pisoni M, Cogotzi L, Frigeri A, Corsi I, Bonacci S, Iacocca A et al. DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy). *Environmental Research*. 2004;96(2):163-175.
140. Broeg K, Lehtonen K. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin*. 2006;53(8-9):508-522.
141. Heddle J, Cimino M, Hayashi M, Romagna F, Shelby M, Tucker J et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: Past, present, and future. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2000;18(4):277-291.

142. Schiedek D, Broeg K, Baršienė J, Lehtonen K, Gercken J, Pfeifer S et al. Biomarker responses as indication of contaminant effects in blue mussel (*Mytilus edulis*) and female eelpout (*Zoarces viviparus*) from the southwestern Baltic Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 2006;53(8-9):387-405.
143. Sforzini S, Oliveri C, Orrù A, Chessa G, Pacchioni B, Millino C et al. Application of a new targeted low density microarray and conventional biomarkers to evaluate the health status of marine mussels: A field study in Sardinian coast, Italy. *Science of The Total Environment*. 2018;628-629:319-328.
144. Kumar N, Krishnani K, Meena K, Gupta S, Singh N. Oxidative and cellular metabolic stress of *Oreochromis mossambicus* as biomarkers indicators of trace element contaminants. *Chemosphere*. 2017;171:265-274.
145. Wong C. Morphological and biochemical changes in the gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to ambient cadmium exposure. *Aquatic Toxicology*. 2000;48(4):517-527.
146. Lopes P, Pinheiro T, Santos M, Daluzmathias M, Collarespereira M, Viegascrespo A. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations (*Leuciscus alburnoides complex*) to inorganic pollutants exposure. *The Science of The Total Environment*. 2001;280(1-3):153-163.
147. Hidalgo J, Flos R. Dogfish metallothionein—I. Purification and characterization and comparison with rat metallothionein. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*. 1986;83(1):99-103.
148. Perić L, Burić P. The effect of copper and chlorpyrifos co-exposure on biomarkers in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Chemosphere*. 2019;225:126-134.
149. Duarte I, Reis-Santos P, França S, Cabral H, Fonseca V. Biomarker responses to environmental contamination in estuaries: A comparative multi-taxa approach. *Aquatic Toxicology*. 2017;189:31-41.

150. Papetti P, Rossi G. Heavy metals in the fishery products of low Lazio and the use of metallothionein as a biomarker of contamination. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2009;159(1-4):589-598.
151. Barhoumi B, Clérandeau C, Gourves P, Le Menach K, El Megdiche Y, Peluhet L et al. Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using combined chemical and biomarker analyses in grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae). *Marine Environmental Research*. 2014;101:184-195.
152. Beg M, Butt S, Al-Dufailee S, Karam Q, Al-Sharrah T, Saeed T. Biomarkers in fish as a measure of the state of marine environment of Kuwait. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2018;190(6).
153. Hoarau P, Damiens G, Roméo M, Gnassia-Barelli M, Bebianno M. Cloning and expression of a GST-pi gene in *Mytilus galloprovincialis*. Attempt to use the GST-pi transcript as a biomarker of pollution. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. 2006;143(2):196-203.
154. Kopecka J, Lehtonen K, Baršienė J, Broeg K, Vuorinen P, Gercken J et al. Measurements of biomarker levels in flounder (*Platichthys flesus*) and blue mussel (*Mytilus trossulus*) from the Gulf of Gdańsk (southern Baltic). *Marine Pollution Bulletin*. 2006;53(8-9):406-421.
155. Pauletto M, Lopparelli R, Pegolo S, Armani M, Zorzan E, Giantin M et al. Significance of the goby *Zosterisessor ophiocephalus* as a sentinel species for Venice Lagoon contamination: Combining biomarker responses and bioaccumulation. *Science of The Total Environment*. 2019;660:959-973.
156. Ramirez E, Arguello M, Ilizaliturri C, Tintos A, Mejia J, Borja I. A brief review of the use of biomarkers in Mexico s aquatic ecosystems pollution assessment: 2001 2002. *Latin American Journal of Aquatic Research*. 2018;46(5):860-879.
157. Stephensen E, Adolfsson-Erici M, Celander M, Hulander M, Parkkonen J, Hegelund T et al. Biomarker responses and chemical analyses in fish indicate leakage of

- polycyclic aromatic hydrocarbons and other compounds from car tire rubber. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2003;22(12):2926.
158. Pustiglione Marinsek G, Moledo de Souza Abessa D, Gusso-Choueri P, Brasil Choueri R, Nascimento Gonçalves A, D'angelo Barroso B et al. Enteric nervous system analyses: New biomarkers for environmental quality assessment. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;137:711-722.
 159. Bebianno M, Santos C, Canário J, Gouveia N, Sena-Carvalho D, Vale C. Hg and metallothionein-like proteins in the black scabbardfish *Aphanopus carbo*. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45(8):1443-1452.
 160. Lionetto M, Caricato R, Giordano M, Pascariello M, Marinosci L, Schettino T. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. *Marine Pollution Bulletin*. 2003;46(3):324-330.
 161. Braga M, Brauko K, Vicentini M, Salgado L, Silva de Assis H, Dolatto R et al. Cytotoxicity and enzymatic biomarkers as early indicators of benthic responses to the soluble-fraction of diesel oil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2018;164:21-31.
 162. Sillero-Ríos J, Sureda A, Capó X, Oliver-Codorniú M, Arechavala-Lopez P. Biomarkers of physiological responses of *Octopus vulgaris* to different coastal environments in the western Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin*. 2018;128:240-247.
 163. Bouzahouane H, Barour C, Sleimi N, Ouali K. Multi-biomarkers approach to the assessment of the southeastern Mediterranean Sea health status: Preliminary study on *Stramonita haemastoma* used as a bioindicator for metal contamination. *Chemosphere*. 2018;207:725-741.
 164. Guo R, Pan L, Ji R. A multi-biomarker approach in scallop *Chlamys farreri* to assess the impact of contaminants in Qingdao coastal area of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2017;142:399-409.

165. Lister K, Lamare M, Burritt D. Oxidative damage and antioxidant defence parameters in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica* as biomarkers for pollution impacts. *Polar Biology*. 2015;38(10):1741-1752.
166. Pereira C, de Souza Abessa D, Bainy A, Zaroni L, Gasparro M, Bícago M et al. Integrated assessment of multilevel biomarker responses and chemical analysis in mussels from São Sebastião, São Paulo, Brazil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007;26(3):462.
167. Rola R, Monteiro M, Reis S, Sandrini J. Molecular and biochemical biomarkers responses in the mussel *Mytilus edulis* collected from Southern Brazil coast. *Marine Pollution Bulletin*. 2012;64(4):766-771.
168. Alves L, Nunes M, Marchand P, Le Bizec B, Mendes S, Correia J et al. Blue sharks (*Prionace glauca*) as bioindicators of pollution and health in the Atlantic Ocean: Contamination levels and biochemical stress responses. *Science of The Total Environment*. 2016;563-564:282-292.
169. Barrera-García A, O'Hara T, Galván-Magaña F, Méndez-Rodríguez L, Castellini J, Zenteno-Savín T. Trace elements and oxidative stress indicators in the liver and kidney of the blue shark (*Prionace glauca*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 2013;165(4):483-490.
170. Endo T, Kimura O, Ogasawara H, Ohta C, Koga N, Kato Y et al. Mercury, cadmium, zinc and copper concentrations and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in tiger sharks (*Galeocerdo cuvier*) culled off Ishigaki Island, Japan. *Ecological Indicators*. 2015;55:86-93.
171. L M, D C. Skin Biopsies as a Sensitive Non-Lethal Technique for the Ecotoxicological Studies of Great White Shark (*Carcharodon carcharias*) Sampled in South Africa. *Expert Opinion on Environmental Biology*. 2016;04(01).
172. Terrazas-López R, Arreola-Mendoza L, Galván-Magaña F, Anguiano-Zamora M, Sujitha S, Jonathan M. Cadmium concentration in liver and muscle of silky shark

- (*Carcharhinus falciformis*) in the tip of Baja California south, México. Marine Pollution Bulletin. 2016;107(1):389-392.
173. Vélez-Alavez M, Labrada-Martagón V, Méndez-Rodríguez L, Galván-Magaña F, Zenteno-Savín T. Oxidative stress indicators and trace element concentrations in tissues of mako shark (*Isurus oxyrinchus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology. 2013;165(4):508-514.
 174. Lyons K, Wynne-Edwards K. Legacy environmental polychlorinated biphenyl contamination attenuates the acute stress response in a cartilaginous fish, the Round Stingray. Stress. 2019;22(3):395-402.
 175. Lyons K, Lavado R, Schlenk D, Lowe C. Bioaccumulation of organochlorine contaminants and ethoxyresorufin-o-deethylase activity in southern California round stingrays (*Urobatis halleri*) exposed to planar aromatic compounds. Environmental Toxicology and Chemistry. 2014;33(6):1380-1390.
 176. Bertrand L, Monferrán M, Métais I, Mouneyrac C, Amé M. MTs in *Palaemonetes argentinus* as potential biomarkers of zinc contamination in freshwaters. Ecological Indicators. 2015;48:533-541.
 177. Hahn M, Woodin B, Stegeman J, Tillitt D. Aryl hydrocarbon receptor function in early vertebrates:. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1998;120(1):67-75.
 178. Filho D, Boveris A. Antioxidant defences in marine fish—II. Elasmobranchs. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology. 1993;106(2):415-418.
 179. Grove R, Henny C, Kaiser J. Osprey: Worldwide Sentinel Species for Assessing and Monitoring Environmental Contamination in Rivers, Lakes, Reservoirs, and Estuaries. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B. 2009;12(1):25-44.
 180. Kroon F, Streten C, Harries S. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. PLOS ONE. 2017;12(4):e0174762.

181. Torres M, Barros M, Campos S, Pinto E, Rajamani S, Sayre R et al. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2008;71(1):1-15.
182. Zhou Q, Zhang J, Fu J, Shi J, Jiang G. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. *Analytica Chimica Acta*. 2008;606(2):135-150.
183. Cotou E, Tsangaris C, Henry M. Comparative study of biochemical and immunological biomarkers in three marine bivalves exposed at a polluted site. *Environmental Science and Pollution Research*. 2012;20(3):1812-1822.

